

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780036316.4

[51] Int. Cl.

*A61K 39/395 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

*C07K 16/28 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年1月13日

[11] 公开号 CN 101626783A

[22] 申请日 2007.8.3

[21] 申请号 200780036316.4

[30] 优先权

[32] 2006.8.4 [33] US [31] 60/835,777

[86] 国际申请 PCT/US2007/075215 2007.8.3

[87] 国际公布 WO2008/019326 英 2008.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2009.3.30

[71] 申请人 诺华有限公司

地址 瑞士巴塞尔

共同申请人 爱克索马技术有限公司

[72] 发明人 J·许 L·马斯塔 J·亚伯拉罕  
M·汉达 S·沙耶尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陶家蓉

权利要求书4页 说明书98页 序列表61页  
附图7页

[54] 发明名称

EPHB3 - 特异性抗体和其应用

[57] 摘要

本发明提供了 EphB3 特异性抗体和包含这种抗体的药物组合物、包含药物组合物的药盒以及预防和治疗癌症的方法。

1. 一种抗体，其结合 EphB3 胞外结构域的亲和力(KD)为  $10^{-6}$  M 或更低，并与以下任何抗体竞争结合 75%以上 EphB3：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。
2. 如权利要求 2 所述的抗体，其与以下任何抗体结合的 EphB3 的表位相同：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。
3. 一种抗体，其包含以下任何抗体的 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。
4. 如权利要求 1-3 中任一项所述的抗体，其特征在于，所述抗体是嵌合抗体、人源化抗体、人工程化抗体、人抗体、单链抗体或抗体片段。
5. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其特征在于，所述 CDR 内的至少一个氨基酸被另一抗 EphB3 抗体的相应 CDR 的相应残基取代。
6. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其特征在于，所述 CDR 内的一个或两个氨基酸是经过修饰的。
7. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其在轻链或重链可变区上与下列抗体有至少 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 相同性：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。
8. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其包含人抗体序列的恒定区和人抗体序列的一个或多个重链和轻链可变框架区。
9. 如权利要求 8 所述的抗体，其特征在于，所述人抗体序列是个体人序列、人共有序列、个体人种系序列或人共有种系序列。
10. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其特征在于，所述重链恒定

区是修饰或未修饰的 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。

11. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其与 EphB3 的结合亲和力为  $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  或  $10^{-9}$  M 或更低。

12. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其 CDR 中包含保守取代。

13. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其包含低风险和中等风险残基的保守或非保守性改变。

14. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其特征在于，所述轻链恒定区是修饰或未修饰的  $\lambda$  轻链恒定区、 $\kappa$  轻链恒定区、其片段或其组合。

15. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其诱导 EphB3 磷酸化。

16. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其诱导 EphB3 寡聚化。

17. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其诱导 EphB3 内化。

18. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其诱导 EphB3 降解。

19. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其诱导 EphB3 信号转导。

20. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其抑制肝配蛋白 B 与 EphB3 结合。

21. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其抑制癌细胞增殖。

22. 如权利要求 21 所述的抗体，其抑制肺癌、卵巢癌、食道癌、结肠癌或乳腺癌细胞增殖。

23. 如前述权利要求中任一项所述的抗体，其偶联于另一种诊断剂或治疗剂。

24. 一种筛选可用于治疗癌症的 EphB3 蛋白胞外域的抗体的方法，该方法包括以下步骤：使包含 EphB3 的 ECD 的多肽接触候选抗体，所述候选抗体含有以下抗体的至少 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018 或 XPA.04.048；检测所述候选抗体与该多肽的结合亲和力，和如果检测到的结合亲和力为至少  $10^{-6}$  M，则将所述候选抗体鉴定为用于治疗癌症的抗体。

25. 一种系统改变抗体和筛选可用于治疗癌症的 EphB3 蛋白胞外域的抗体的方法，该方法包括以下步骤：制备抗体 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、

XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 的 CDR 内一个或两个氨基酸被修饰的候选抗体；使包含 EphB3 的 ECD 的多肽接触所述候选抗体；检测所述候选抗体与该多肽的结合亲和力，和如果检测到的结合亲和力为至少  $10^{-6}$  M，则将所述候选抗体鉴定为用于治疗癌症的抗体。

26. 一种筛选可用于治疗癌症的 EphB3 蛋白胞外域的抗体的方法，该方法包括以下步骤：使肺、卵巢、食道、结肠或乳腺细胞与含有抗体 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 的至少 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 的候选抗体或者一个或多个 CDR 内含有一个或两个氨基酸修饰的抗体相接触；检测所述细胞的增殖或存活；和如果检测到细胞增殖或存活下降，则将所述候选抗体鉴定为用于治疗癌症的抗体。

27. 一种治疗患有癌症的对象的方法，该方法包括给予治疗有效量的前述权利要求中任一项所述抗体的步骤。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其特征在于，所述癌症是肺癌、卵巢癌、食道癌、结肠癌或乳腺癌。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，给予第二治疗剂。

30. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述对象还接受放疗或手术治疗。

31. 一种靶向表达 EphB3 的肿瘤细胞的方法，该方法包括给予与放射性核素或其他毒素偶联的前述权利要求中任一项所述的抗体的步骤。

32. 如权利要求 27-31 中任一项所述的方法，其特征在于，所述对象是哺乳动物。

33. 如权利要求 32 所述的方法，其特征在于，所述对象是人。

34. 一种包含核苷酸序列的分离核酸分子，所述核苷酸序列编码权利要求 1-23 中任一项所述的抗体的重链或轻链。

35. 一种表达载体，其包含与调控序列操作性连接的权利要求 34 所述核酸分子。

36. 一种宿主细胞，其包含权利要求 35 所述的载体或权利要求 48 所述的核酸分子。

37. 一种利用权利要求 36 所述宿主细胞制备抗体的方法，该方法包括在合适的条件下培养权利要求 36 所述的宿主细胞以及回收所述抗体。

38. 一种通过权利要求 37 所述方法制备的抗体。

39. 如权利要求 1-23 或 38 中任一项所述的抗体，其按重量计纯化至少 95%均一。

40. 一种药物组合物，其包含权利要求 39 所述的抗体和药学上可接受的载体。

41. 一种包含前述权利要求中任一项所述抗体的药盒，该药盒包括包装在容器中的治疗有效量的本发明抗体，所述药盒任选包括第二治疗剂，还可以包括粘帖在容器上或者包装在容器内的标签，标签上注明容器的内容物并指导和/或说明如何使用容器的内容物来治疗癌症。

42. 如权利要求 41 所述的药盒，其特征在于，所述容器是药瓶或小瓶或预装注射器。

## EPHB3-特异性抗体和其应用

### 技术领域

本发明涉及通过给予 EphB3-特异性抗体预防和治疗癌症的方法。

### 发明背景

癌症是美国的第二大死因。虽然用"癌症"描述许多不同类型的癌症，即乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌，但各种类型的癌症在表型水平和遗传水平均有差异。当由于突变或外遗改变而使一个或多个基因的表达变得无法调控时出现癌症特征性的生长不受调节，细胞生长可能不再受到控制。

生长控制基因通常分为两类，癌基因和肿瘤抑制基因。癌基因的正常功能是促进细胞生长，但是只在特定条件下才有这种功效。当癌基因发生突变而无法被特异性控制时，它在各种条件下都能促进细胞生长。然而，发现只有使癌细胞的肿瘤抑制基因发生突变才能真正成功地形成癌症。肿瘤抑制基因的正常功能是阻止细胞生长。肿瘤抑制基因的例子包括 p53、p16、p21 和 APC，所有这些基因在正常发挥作用时都可阻止细胞发生分裂和不可控地生长。当肿瘤抑制基因发生突变或丢失时，其抑制细胞生长的功能也丢失，使细胞发生不受正常限制的的生长。

EphB3 是肝配蛋白受体酪氨酸激酶家族的受体。目前，在人体中发现 14 种 Eph 受体和 9 种肝配蛋白配体。肝配蛋白受体(Eph)和其配体肝配蛋白能介导多种发育过程，特别是神经系统和血管系统的发育过程。也了解肝配蛋白在肿瘤发生、血管新生、转移生长和细胞存活中起到一定作用。根据其结构和序列关系，肝配蛋白分为肝配蛋白-A(EFNA)和肝配蛋白-B(EFNB)，肝配蛋白-A 通过糖基磷脂酰肌醇连接锚定于膜，而肝配蛋白-B 是跨膜蛋白。根据胞外结构域序列的相似性和与肝配蛋白-A 和肝配蛋白-B 配体的结合亲和力，将 Eph 受体家族分为两类。Eph 受体是受体酪氨酸激酶(RTK)家族中最大的子类。

Eph 受体与癌症有关。用 EphA1 转染并植入裸小鼠的 NIH3T3 细胞在 5-6

周内产生 10 mm<sup>3</sup> 肿瘤，而载体对照在相同时间内不产生任何肿瘤(Maru 等, *Oncogene*. 1990 年 3 月; 5(3): 445-7)。与正常组织相比, EphB2 在胃癌(12/16)、结肠癌(3/11)、食道癌(3/6)、卵巢癌(1/7)、肾癌(1/2)和肺癌(1/1)中的表达水平较高(Kiyokawa 等, *Cancer Res* 1994 年 7 月 15 日; 54(14): 3645-50)。EphB6 表达与低级神经母细胞瘤相关联。EphB6 的激酶结构域无活性, 因此认为这种受体用作天然产生的显性负受体(Tang 等, *Clin Cancer Res* 1999 年 6 月; 5(6): 1491-6)。

有越来越多的证据表明 Eph 和肝配蛋白参与血管新生。据报道, 肝配蛋白 A1、肝配蛋白 B1、肝配蛋白 B2、EphB2、EphB3 和 EphB4 在血管中表达。肝配蛋白 A1 可诱导大鼠角膜模型的血管新生, 肝配蛋白 A1 的抗体在相同模型中可抑制 TNF- $\alpha$  诱导的血管新生(Pandey 等, *Science* 1995 年 4 月 28 日; 268(5210):567-9)。在畸胎瘤衍生的鼠细胞系 P19 和人肾微血管内皮细胞(HRMEC)中, 成簇肝配蛋白 B1 诱导细胞粘附和毛细管样组装(Stein 等, *Genes Dev* 1998 年 3 月 1 日; 12(5):667-78)。成簇肝配蛋白 B1 和肝配蛋白 B2 也可诱导肾上腺皮质衍生的微血管内皮细胞(ACE)出芽(Adams 等, *Genes Dev* 1999 年 2 月 1 日; 13(3):295-306)。在爪蟾胚胎中注射显性负 EphB4 受体 RNA 引起肌节间静脉异常地凸入邻近的体节中(Helbling 等, *Development* 2000 年 1 月; 127(2):269-78)。EphB2/EphB3 双敲除、EphB4 和肝配蛋白 B2 敲除小鼠均有血管重塑缺陷(Adams 等, 1999; Wang 等, *Cell* 1998 年 5 月 29 日; 93(5):741-53; PCT WO 00/30673)。

Eph 也可能在转移中起到一定作用。用 EphB3 或 EphB2 转染的 293T 人上皮肾细胞在体外对纤连蛋白或胶原包被表面的细胞粘附下降。293 细胞无法粘附是 EphB2 磷酸化 R-ras、随后造成整联蛋白失活引起的(Zou 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 年 11 月 23 日; 96(24):13813-8)。

在激活后, Eph 似乎通过信号转导起作用。肝配蛋白结合诱导 Eph 受体寡聚化, 引起 Eph 的近膜残基磷酸化。活化的 Eph 含有多个磷酸化酪氨酸, 用作信号转导蛋白(如 RasGAP、Src、LMW-PTP、PLC $\gamma$ 、PI3-激酶、Grb2 和含 PDZ 的蛋白质)的停靠位点。

Eph 受体(EphA1、EphA2、EphB2)的过度表达在不存在受体超磷酸化时引

起转化。磷酸化 EphB 受体负向调节 Ras-MAP-激酶通路和 FAK 信号转导，阻碍细胞生长。

EphB3(也称为 Hek2、Sek4、Mdk5、Tyro6、Cek10 和 Qek10)是肝配蛋白 B 家族成员(肝配蛋白 B1、肝配蛋白 B2 和肝配蛋白 B3)的受体，已知在正常组织以及某些肿瘤和癌细胞系中表达。然而迄今为止，尚不明了 EphB3 在癌症中的作用。因此，需要鉴定调节 EphB3 的组合物和方法，及其在这类癌症中的作用。本发明涉及这些，以及其它重要需求。

### 发明内容

EphB3 的核苷酸序列列于 SEQ ID NO:1，氨基酸序列列于 SEQ ID NO:2。其胞外结构域(ECD)由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1-559 组成。或者，ECD 由 SEQ ID NO:2 的 34-555 组成(注意 NCBI Entrez 蛋白质序列数据库中只有两个基因座编号对应于人 EphB3)。在这两种情况下，研究人员根据这些序列作出以下预测：(a)ATG 起始密码子至终止密码子的编码区编码的氨基酸数目；(b)前体序列中哪一个氨基酸臂代表分泌信号序列(在成熟过程中切除该序列以产生成熟蛋白质)；和(c)哪一个残基臂代表跨膜区。由于在任何情况下成熟蛋白质的“胞外”结构域总是在信号序列和跨膜区之间，所以 ECD 的预测程度取决于安置信号和 TM 区的位置。根据这两个基因座(NP\_004434 和 P54753)预测，前体长度是 998 个氨基酸，分泌信号跨残基 1-33。因此，它们都符合 ECD 的起点是残基 34。然而，它们在 TM 区起点方面不相符：NP\_004434 预测该起点是残基 556 (使 ECD 末端的氨基酸编号为 555)，而 P54753 预测 TM 的起点是残基 560 (使 ECD 末端的氨基酸编号为 559)。如本文实施例所述，利用由氨基酸 37-558 组成的 ECD 进行免疫，以产生抗体。

本发明的材料和方法满足本领域的上述和其它相关需要。

在本发明的一个实施方式中，提供能以  $10^{-6}$  M 或更低的亲和力(KD)结合 EphB3 胞外结构域并与以下任何抗体竞争结合 75%以上 EphB3 的抗体：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。术语  $10^{-6}$  M 或更低的亲和力"是指亲和力是，例如， $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  M、



$10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M 或  $10^{-12}$  M (即低于  $10^{-6}$  M 的数值)。在另一实施方式中, 该抗体与下列任一抗体所结合的 EphB3 的表位相同: XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。在又一实施方式中, 提供包含下列任一抗体的 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 的抗体: XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885。在又一实施方式中, 上述抗体是嵌合抗体、人源化抗体、人工程抗体、人抗体、单链抗体或抗体片段。

在本发明的另一实施方式中, 本发明所提供的上述抗体的 CDR 内至少有一个氨基酸被另一抗 EphB3 抗体的相应 CDR 的相应残基取代。在示范性实施方式中, 本发明提供的上述抗体中选自下组的抗体的 CDR 内至少有一个氨基酸被另一抗 EphB3 抗体的相应 CDR 的相应残基取代: XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 和 XHA.05.885。在另一示范性实施方式中, 本发明提供的上述抗体中选自 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 的抗体的 CDR 内至少一个氨基酸被选自 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 的另一抗体的相应 CDR 的相应残基取代。在另一实施方式中, 本发明所提供的上述抗体的 CDR 内有一个或两个氨基酸被修饰。在又一实施方式中, 该抗体的轻链或重链可变区与抗体 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 至少保持 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99% 相同。在另一实施方式中, 上述抗体包含人抗体序列的恒定区以及人抗体序列的一个或多个重链和轻链可变框架区。在另一个实施方式中, 本发明提供的上述抗

体中人抗体序列是个体人序列、人共有序列、个体人种系序列或人共有种系序列。

在另一实施方式中，本发明提供的上述抗体中重链恒定区是修饰的或未修饰的 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、其片段或其组合。在另一实施方式中，该抗体与 EphB3 的结合亲和力为  $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  或  $10^{-11}$  M 或更低。在又一实施方式中，本发明所提供的上述抗体在 CDR 内有保守取代。在另一实施方式中，本发明所提供的上述抗体包含低和中等风险残基上的保守或非保守改变。在另一实施方式中，本发明所提供的上述抗体中轻链恒定区是修饰的或未修饰的  $\lambda$  轻链恒定区、 $\kappa$  轻链恒定区、其片段或其组合。

在本发明的另一实施方式中，本发明所提供的上述抗体能诱导 EphB3 磷酸化、诱导 EphB3 寡聚化、诱导 EphB3 内化、诱导 EphB3 降解、诱导 EphB3 信号转导、抑制肝配蛋白 B 与 EphB3 结合和/或抑制癌细胞增殖。在又一实施方式中，本发明提供的上述抗体能抑制肺癌、卵巢癌、食道癌、结肠癌或乳腺癌细胞增殖。在另一实施方式中，本发明提供上述抗体与另一诊断剂或治疗剂的偶联物。

本发明考虑了许多方法。在本发明的一个实施方式中，提供筛选可用于治疗癌症的与 EphB3 蛋白胞外结构域结合的抗体的方法，所述方法包括以下步骤：使包含 EphB3 的 ECD 的多肽接触候选抗体，候选抗体含有以下抗体的至少 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR：XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885；检测候选抗体与该多肽的结合亲和力，如果检测到的结合亲和力为至少  $10^{-6}$  M，则将该候选抗体鉴定为用于治疗癌症的抗体。在又一实施方式中，本发明提供了系统改变抗体和筛选可用于治疗癌症的与 EphB3 蛋白胞外结构域结合的抗体的方法，所述方法包括以下步骤：制备抗体 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 的 CDR 内一个或两个氨基酸被修饰的候选抗体；使包含 EphB3 的 ECD 的多肽接触候选抗体；检测候选抗体与该多肽的结合亲和力，如果检测到的结合亲和力为至少  $10^{-6}$  M，则将该候选抗体鉴定为用于治疗癌症

的抗体。

在又一实施方式中，提供筛选可用于治疗癌症的与 EphB3 蛋白胞外结构域结合的抗体的方法，所述方法包括以下步骤：使肺、卵巢、食道、结肠或乳腺细胞与含有抗体 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 或 XHA.05.885 的至少 1、2、3、4、5 或 6 个 CDR 的候选抗体或者一个或多个 CDR 内含有一个或两个氨基酸修饰的抗体相接触；检测细胞的增殖或存活；如果检测到细胞增殖或存活下降，则将该候选抗体鉴定为可用于治疗癌症的抗体。

在又一实施方式中，本发明提供治疗患有癌症的对象的方法，所述方法包括给予治疗有效量的上述抗体的步骤。在相关实施方式中，所述癌症是肺癌、卵巢癌、食道癌、结肠癌或乳腺癌。在又一实施方式中，给予第二治疗剂。在另一实施方式中，还用放疗或手术治疗所述对象。在另一实施方式中，本发明提供用于医疗，包括用于治疗癌症(例如通过上述方法治疗)的本发明抗体。在其它实施方式中，本发明提供本发明抗体在制备癌症治疗药物中的应用。可将该药物与第二治疗剂和/或放疗联合给予患者。

在本发明的另一实施方式中，提供了靶向表达 EphB3 的肿瘤细胞的方法，该方法包括给予偶联于放射性核素或其他毒素的上述抗体的步骤。另一实施方式中，本发明提供的上述方法中的对象是哺乳动物。在另一实施方式中，所述对象是人。

在本发明的另一实施方式中，提供分离的核酸分子，其包含编码上述抗体的重链或轻链的核苷酸序列。在又一实施方式中，提供一种表达载体，其包含操作性连接于调控序列的上述核酸分子。在又一实施方式中，提供一种宿主细胞，其包含上述载体和上述核酸分子。在又一实施方式中，提供使用上述宿主细胞产生抗体的方法，该方法包括在适当条件下培养所述宿主细胞和回收所述抗体。在另一实施方式中，提供上述方法产生的抗体。

在本发明的另一实施方式中，本发明提供了按重量计纯化至至少 95% 均一的上述抗体。在另一实施方式中，提供一种药物组合物，其包含上述抗体和药学上可接受的载体。在又一实施方式中，提供一种包含上述抗体的药盒，

其包括包装在容器中的治疗有效量的本发明抗体，其中所述药盒任选包括第二治疗剂，还可以包括粘帖在容器上或者包装在容器内的标签，标签上注明容器的内容物并指导和/或说明如何使用容器的内容物来治疗癌症。在另一实施方式中，本发明所提供的上述药盒中容器是药瓶或小瓶或预装注射器。

### 附图简要说明

图 1 显示 FACS 分析结果，说明 mAb-诱导的 EphB3 内化/降解。

图 2 显示抗-EphB3 mAb 引发 SW620 细胞中 EphB3 的磷酸化。

图 3 显示在低抗体浓度下，抗-EphB3 抗体诱导 EphB3 磷酸化。

图 4 显示抗 EphB3 mAb 不仅诱导 EphB3 内化，还诱导降解。

图 5 显示一小类 mAb 在至少 72 小时中降低 EphB3 蛋白水平。

图 6 显示多种细胞系通过磷酸化 EphB3 对激动性 mAb 产生反应。

图 7 显示 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048 轻链和重链的风险曲线(H=高风险, M=中等风险, L=低风险), XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048 轻链和重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID NO: 3-10) 以及 CDR H1、H2 和 H3 在氨基酸序列中的位置。

### 发明详述

本发明提供了 EphB3 特异性抗体、包含这种抗体的药物制剂、制备该抗体和药物制剂的方法以及利用药物制剂和化合物治疗患者的方法。本发明抗体可能具有结合 EphB3、诱导 EphB3 磷酸化、诱导 EphB3 寡聚化、诱导 EphB3 内化、诱导 EphB3 降解、诱导 EphB3 信号转导和/或调节 EphB3 介导的细胞粘附的所需生物学活性。

在一个实施方式中，本发明抗体用作本发明多肽的激动剂。因此，在一些实施方式中，本发明抗体可激活或诱导其结合的靶抗原的功能(如提高靶点的功能，如磷酸化活性或胞内信号转导)。

在一些实施方式中，本发明抗体结合本文所述表位或其一部分。在一些实施方式中，抗体与受体的结合诱导受体降解。在一些实施方式中，抗体与受体

的结合诱导受体寡聚化。在一些实施方式中，抗体与受体的结合诱导受体磷酸化。在一些实施方式中，抗体与受体的结合诱导受体活化。可通过本领域已知技术测定受体活化(即信号转导)。例如，可通过免疫沉淀后 Western 印迹分析来检测受体或其底物的磷酸化(如酪氨酸或丝氨酸/苏氨酸磷酸化)，以确定受体活化。在一些实施方式中，与该抗体不存在时的活性相比，本发明提供的抗体将本文所述的配体活性或受体活性调节至少 95%、至少 90%、至少 85%、至少 80%、至少 75%、至少 70%、至少 60%或至少 50%。

在一些实施方式中，EphB3 抗体刺激 EphB3 与胞内衔接蛋白结合。在一些实施方式中，EphB3 抗体抑制 FAK、Erk/MAPK 通路、Cdc42/Rac 通路和/或使它们失活，激活 RasGAP，抑制 Abl/Arg、Fyn、Src、LMW-PTP、交叉蛋白、Cdc42 通路、开里蛋白(Kalirin)或 Rac 通路和/或使它们失活。在一些实施方式中，EphB3 抗体使 R-ras 失活或激活多配聚糖。在一些实施方式中，EphB3 抗体导致 R-Ras 磷酸化。

本文所用术语"胞内衔接蛋白"指连接信号转导复合物的不同部分的蛋白质。衔接蛋白可以具有或不具有酶活性。本领域已知衔接蛋白的例子。例如，Grb2 是本身不具有酶活性的衔接蛋白，而 RasGAP 是具有酶活性的衔接蛋白。

本发明的抗体还可具有结合癌细胞上表达的 EphB3 的所需生物学活性，因此可用于将细胞毒治疗靶向癌细胞。

根据体外试验分析发现，几种优选的小鼠抗体或嵌合抗体具有较高的亲和力和功效，这些抗体通过 Studnicka 等的人工程化(Human Engineered)<sup>TM</sup>方法改造后其对人体的免疫原性降低。简言之，将重链和轻链可变区的表面暴露氨基酸残基修饰成人残基，经测定这些位置的氨基酸改变不可能对抗原结合或蛋白折叠产生不良影响，同时可以降低其在人体环境内的免疫原性。构建编码修饰的重链和/或轻链可变区的合成基因并且连接到人  $\gamma$  重链和/或  $\kappa$  轻链恒定区的编码序列上。所有的人重链和轻链恒定区都可与人工程化<sup>TM</sup>抗体可变区联用。将人重链和轻链基因导入到哺乳动物细胞内，收获产生的重组免疫球蛋白产物并分析其特征。

本发明抗体的例子包括 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048、XHA.05.337、XHA.05.200、XHA.05.111、XHA.05.005、

XHA.05.228、XHA.05.030、XHA.05.964 和 XHA.05.885。根据布达佩斯条约的规定，于 2006 年 8 月 4 日将以下抗体分泌型杂交瘤保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC，美国弗吉尼亚州玛纳萨斯 20110-2209 大学大街 10801 号)：

<u>杂交瘤名称</u>	<u>ATCC 保藏号</u>
XHA.05.337	PTA-7779
XHA.05.200	PTA-7786
XHA.05.111	PTA-7785
XHA.05.005	PTA-7782
XHA.05.228	PTA-7781
XHA.05.030	PTA-7780
XHA.05.964	PTA-7784
XHA.05.885	PTA-7783

下面所提供的定义用于帮助更完整地理解本发明。

#### 一般定义

本文所用的靶抗原人“EphB3”是指与 SEQ ID NO:2 具有基本相同的氨基酸序列的人多肽及其天然的等位基因和/或变体。“EphB3 的 ECD”用于本文中是指 SEQ ID NO:2 的 37 到 558 位氨基酸所代表的 EphB3 的胞外部分(也参见上文中有关 ECD 分类的讨论)。

本文所用“肿瘤”是指所有的成瘤性细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，以及所有的癌前和癌的组织。

术语“癌症”和“癌”是用于描述哺乳动物的生理病症，其典型特征是细胞生长失控。癌症的例子包括但不限于：鳞状细胞和小细胞肺癌、食道鳞状细胞癌、卵巢透明细胞癌、结肠腺癌和乳腺浸润性导管癌。

“治疗”是指为了阻止疾病发生或改变疾病病理学而进行的干预措施。因此，“治疗”既指治疗性措施又指预防性方法。需要治疗的那些患者包括已经患病的人以及那些需要预防疾病发生的人。对于肿瘤(例如，癌)治疗来说，治疗性药物可直接减轻肿瘤细胞的病理学活性，或者使肿瘤细胞对其他治疗措施如放疗和/或化疗变得更敏感。对产生临床、生化、放射学或主观症状的患者的治疗包括减轻某些或全部这类症状，或者减少疾病的诱因。癌

的“病理学”包括危害患者健康的所有现象。这包括而不限于异常的或失控的细胞增生、转移、对临近细胞正常功能的干扰、细胞因子或其他分泌产物异常水平的释放、炎症或免疫反应的抑制或恶化等。因此，通过治疗后病情改善可表现为肿瘤缩小、肿瘤生长速度下降、已有肿瘤细胞或转移瘤细胞的破坏、和/或转移瘤缩小或数目减少。

可被治疗的“哺乳动物”是指可被分类为哺乳动物的任何动物，其中包括人、家畜、以及动物园动物、体育动物或宠物，如狗、马、猫、牛等。优选的哺乳动物是人。

本文所用的术语“治疗有效量”是指对于本发明的实施方式来说是合适的，当按照所需治疗方案给药时能够引发所需治疗性或预防性效应或反应的治疗性或预防性抗体的用量，所述效应或反应包括某些或所有疾病症状的减轻，或者疾病易感性的降低。

### 抗体

术语“免疫特异性”或“特异性结合”指抗体与 EphB3 或其 ECD 结合的  $K_a$  大于或等于约  $10^4 \text{ M}^{-1}$ ，优选大于或等于约  $10^5 \text{ M}^{-1}$ ，更优选大于或等于约  $10^6 \text{ M}^{-1}$ 。抗体与靶抗原的亲和力明显高于其它无关分子。与直向同源物或同源物相比，抗体与靶抗原的亲和力还可以明显高出，例如，至少 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、 $10^3$  倍、 $10^4$  倍、 $10^5$  倍、 $10^6$  倍或更高。或者，抗体与已知同源物或直向同源物的交叉反应可能是有用的。

本发明抗体的特征还可以是亲和力( $K_D$ )为至少  $10^{-4} \text{ M}$ ，优选至少约  $10^{-4} \text{ M}$  到  $10^{-12} \text{ M}$ ，更优选至少约  $10^{-5} \text{ M}$ 、 $10^{-6} \text{ M}$ 、 $10^{-7} \text{ M}$  或  $10^{-8} \text{ M}$ 、 $10^{-9} \text{ M}$ 、 $10^{-10} \text{ M}$  或  $10^{-11} \text{ M}$ 。合适的抗体亲和力可取决于治疗应用。例如，虽然亲和力非常高的抗体可能最适合用作癌症治疗剂，但亲和力非常高的抗体可能对实体瘤的穿透能力差。因此，亲和力约为  $10^{-6}$  至  $10^{-10} \text{ M}$  的抗体可能更适合用作实体瘤治疗剂。利用常规技术可以很容易确定这种亲和力，例如通过平衡透析；按照厂家提供的通用方法通过使用 BIAcore 2000 设备；利用放射性标记的靶抗原进行放免分析，或者本领域技术人员熟知的其他方法。亲和力数据可利用，例如，Scatchard 等，Ann N.Y. Acad. Sci., 51:660 (1949)的

方法分析。

"激动性抗体"指能够激活或诱导其结合的靶抗原功能的抗体分子。因此，"激动性"抗靶抗体能够提高靶点功能，如磷酸化活性或胞内信号转导。

术语"抗体"的含义很广，其中包括完全组装抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如，双特异性抗体)、能结合抗原的抗体片段(例如，Fab'、F'(ab)<sub>2</sub>、Fv、单链抗体、双抗体)以及包含上述抗体的重组肽，只要它们具有理想的生物学活性就可以。抗体片段可通过重组 DNA 技术或完整抗体的酶促或化学切割来制备，这些将在下文作进一步描述。单克隆抗体的非限定性例子包括鼠、嵌合、人源化、人和人工程化™免疫球蛋白、抗体、具有免疫球蛋白序列的嵌合融合蛋白、或其突变蛋白或衍生物，这些在下文都有进一步描述。本发明还提供了完整分子和/或片段的多聚物或聚集体，包括化学衍生抗体。任何同种型或亚型的抗体也包括在本发明的范围之内。

本文所用的术语"单克隆抗体"是指从一群基本同源的抗体中获得的抗体，即，这个群所包含的各个抗体除了可能天然发生的数量很少的突变和另路翻译后修饰以外都是相同的。单克隆抗体是有高度特异性的，与通常包含抗不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体不同，每一个单克隆抗体都只识别抗原上的一个决定簇。除了其特异性之外，单克隆抗体的优点还在于它是由均一的培养物产生的，不会被具有不同特异性和特征的其他免疫球蛋白污染。

修饰语"单克隆"是指抗体来自于一群基本同源的抗体的特征，不应该被解释为需要通过任何特定的方法制备抗体。例如，本发明所用的单克隆抗体可通过 Kohler 等，1975，*Nature*，256:495 首先描述的杂交瘤方法制备，或者通过重组 DNA 方法制备(参见，例如，美国专利号 4,816,567)。例如，"单克隆抗体"还可以是重组抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、人工程化™抗体或抗体片段。

"分离的"抗体是已被鉴定并且从其天然环境的组分中分离和回收出来的抗体。其天然环境的污染组分是指能干扰抗体的诊断或治疗用途的材料，其中包括酶、激素以及其他蛋白或非蛋白溶解物。在优选实施方式中，抗体被纯化成为(1)根据 Lowry 方法测定重量百分比超过 95%，最优选的超过 99%，(2)纯度足以满足用旋压杯氏测序仪可获得至少 15 个 N 端残基或内部氨基酸序列，或



者(3)在还原或非还原条件下进行 SDS-PAGE 并通过考马斯亮蓝或优选的银染色,结果显示是均质性的。分离抗体包括重组细胞内的原位抗体,其中抗体天然环境的至少一个组分已不存在。但是,一般而言,分离抗体要至少通过一个纯化步骤制备。

“免疫球蛋白”或“天然抗体”是四聚体糖蛋白。在天然免疫球蛋白中,每一个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对多肽链包含一个“轻链”(约 25 kDa)和一个“重链”(约 50-70kDa)。每条链的氨基端部分包含约 100 到 110 或更多氨基酸组成的“可变区”,主要负责抗原识别。每条链的羧基端定义恒定区,主要负责效应功能。根据其重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可被分成不同的类。重链可被分成  $\mu$ 、 $\Delta$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$  和  $\epsilon$ , 分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。这些类中的几个类又可进一步分成亚类或同种型,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。不同的同种型有不同的效应功能;例如, IgG1 和 IgG3 同种型有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。人轻链可分为  $\kappa$  和  $\lambda$  轻链。在轻链和重链内,可变区和恒定区通过约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包括约 10 多个氨基酸的“D”区。参见,《基础免疫学》(Fundamental Immunology)第七章(Paul, W.编辑,第 2 版,纽约莱文出版社(Raven Press, N.Y.) (1989))。

有关抗体的结构和制备方法的详细描述参见 Roth, D.B.和 Craig, N.L., *Cell*, 94:411-414(1998), 本文已完整纳入作为参考。简言之,制备编码重链和轻链免疫球蛋白序列的 DNA 的过程主要发生在发育的 B 细胞内。在重排和连接各种免疫球蛋白基因区段之前, V、D、J 和恒定区(C)基因区段通常出现在单个染色体的相对近端。在 B 细胞分化过程中, V、D、J(或者,轻链基因只有 V 和 J)基因区段的合适家族成员的每一成员重组形成功能重排的重链和轻链免疫球蛋白基因的可变区。这个基因区段重排过程是依次出现的。首先,重链 D-J 连接发生,然后是重链 V-DJ 连接和轻链 V-J 连接。除了 V、D 和 J 区段重排以外,免疫球蛋白重链和轻链的基本组成成分还会产生其他多样性,这种多样性的发生是通过轻链 V 和 J 区段连接处以及重链 D 和 J 连接处的可变重组。轻链的这种突变通常发生在 V 基因区段的最后一个密码子和 J 区段的第一密码子之内。连接处相似的不精确性也发生在 D 和  $J_H$  区段之间的重链染色体

上, 其范围可达 10 个核苷酸之多。另外, D 和 J<sub>H</sub> 以及 V<sub>H</sub> 和 D 基因区段之间还可能插入几个核苷酸, 这些核苷酸不是由基因组 DNA 编码的。这些核苷酸的添加被称为 N 区多样性。可变区基因区段内的这种重排以及这种连接期间发生的可变重组的净效应就是主要抗体库的产生。

“抗体片段”包含完整全长抗体(其中包括, 例如, 人抗体)的一部分, 优选包含完整抗体的抗原结合区或可变区, 抗体片段包括抗体片段所形成的多特异性抗体。抗体片段的非限制性例子包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fd、域抗体(dAb)、补体决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、线性抗体、螯合的重组抗体、三抗体或双抗体、胞内抗体、纳米抗体、小模块免疫药物(SMIP)、抗原结合区免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体(camelized antibody)、含 VHH 的抗体或其突变体或衍生物, 以及包含免疫球蛋白的至少一部分, 如 CDR 序列从而足以赋予多肽抗原结合特异性的多肽, 只要抗体保留所需的生物学活性。

木瓜蛋白酶消化抗体后可产生两个相同的被称为“Fab”片段的抗原结合片段和一个残留的“Fc”片段, 每个 Fab 片段包含一个抗原结合位点, Fc 片段的名称反应了它很容易结晶化 35 的能力。胃蛋白酶处理可产生包含两个“Fv”片段的 F(ab')<sub>2</sub> 片段。“Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。这个结构域包含由一个重链可变区和一个轻链可变区紧密非共价相连组成的二聚体。在这种构型中, 每一个可变区的三个 CDR 相互作用定义 VH VL 二聚体表面的抗原结合位点。6 个 CDR 共同赋予抗体以抗原结合特异性。但是, 即使一个可变区(或者只包含三个抗原特异性 CDR 的 Fv 的一半)也能够识别和结合抗原。

“单链 Fv”或“sFv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 区, 其中这些区存在于一条多肽链上。优选的是, Fv 多肽还包含位于 VH 和 VL 区之间的多肽接头, 这种接头可使 Fv 形成抗原结合所需的理想结构。有关 scFv 的综述参见 Pluckthun 的《单克隆抗体药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies) 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编辑, 纽约 SV 出版社(Springer-Verlag, New York), 269-315 页(1994)。

Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab 片段与 Fab'

片段的区别在于后者的重链 CH1 区羧基端包含几个残基，其中包含一个或多个来源于抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH 在本文中被定义为恒定区的半胱氨酸残基包含游离巯基的 Fab'。F(ab')<sub>2</sub> 抗体片段最初制备成 Fab' 片段对，两个 Fab' 片段之间有铰链区半胱氨酸。

术语“超变区”是指抗体上的负责抗原结合的氨基酸残基。超变区包含“补体决定区”或 CDR 来源的氨基酸残基[即，轻链可变区的 24-34(L1)、50-56 (L2) 和 89-97(L3)位氨基酸，重链可变区的 31-35(H1)、50-65(H2)和 95-102 (H3)位氨基酸，如 Kabat 等，《免疫学感兴趣蛋白质的序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest)，第 5 版，位于马里兰州贝沙达的国立健康研究所的公众健康服务部(Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (1991)所述]和/或来自于超变环的那些残基(即，轻链可变区的 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)位氨基酸，重链可变区的 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3)位氨基酸，如 Chothia 等，*J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987)所述]。

“框架”或 FR 残基是指那些超变区残基之外的可变区残基。

术语“恒定区”是指赋予抗体效应功能的抗体分子部分。

术语“嵌合抗体”用于本文中是指包含起源于两种不同抗体的序列的抗体(参见，例如，美国专利号 4,816,567)，这两种抗体通常起源于不同物种。最常见的是，嵌合抗体包含人和小鼠的抗体片段，通常是人的恒定区和小鼠的可变区。

术语“突变蛋白”指在可变区或与可变区等价的区域包含至少一个氨基酸取代、缺失或插入的抗体多肽序列，但是突变蛋白还保留了所需的结合亲和力或生物学活性。突变蛋白与亲本抗体基本同源或基本相同。

术语“衍生物”与本发明的抗体联用时是指通过一些技术如泛素化、连接治疗性或诊断性试剂、标记(例如，用放射性核素或各种酶标记)、共价聚合物粘附如聚乙二醇化(衍生自聚乙二醇)以及通过化学合成非天然氨基酸进行插入或取代来共价修饰的抗体。本发明的衍生物保留了本发明的非衍生分子的结合特性。

本文所用的术语“抗体”尤其包括下列保留了与 EphB3 胞外域的结合能力的任一分子：

1) 具有图 7 所示的氨基酸序列的亲本抗体的氨基酸突变蛋白, 其中包括所包含的重链可变区氨基酸序列与亲本氨基酸序列至少有 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%同源性的突变蛋白, 和/或所包含的轻链可变区氨基酸序列与亲本氨基酸序列至少有 60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98 或 99%同源性的突变蛋白, 计算同源性时考虑相似氨基酸;

2) 包含亲本抗体的一个或多个不同决定区(CDR)的 EphB3 结合多肽, 其中的亲本抗体包含图 7 所示的氨基酸序列, 优选的是至少包含重链的 CDR3, 优选包含两个或两个以上、或者 3 个或 3 个以上、或者 4 个或 4 个以上、或者 5 个或 5 个以上、或者所有 6 个 CDR;

3) 根据 Studnicka 等, 美国专利号 5,766,886 和本文实施例 5 所述的方法, 利用 Kabat 编号鉴定低、中和高风险残基, 通过改变亲本序列制备的人工程化<sup>TM</sup>抗体; 这种抗体包含下列重链的至少一个和下列轻链的至少一个: (a)与人参考免疫球蛋白序列相应残基不同的所有低风险啮齿类残基已被修饰成与人参考免疫球蛋白序列的人残基相同的残基的重链, 或(b)如果需要, 所有低和中等风险啮齿类残基已被修饰成与人参考免疫球蛋白序列相同的残基的重链, (c)如果需要, 所有低风险残基已被修饰成与人参考免疫球蛋白序列相同的残基的轻链, 或(b)如果需要, 所有低和中等风险残基已被修饰成与人参考免疫球蛋白序列相同的残基的轻链。

4) 上述段落(3)中所述抗体的突变蛋白, 该突变蛋白所包含的重链或轻链、或者重链可变区或轻链可变区与原始的啮齿类轻链的氨基酸序列相同性为至少 60%, 更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95%, 其中包括例如, 65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和 100%;

5) EphB3 结合多肽, 其包含啮齿类抗体的一个或多个 CDR 的高风险残基, 以及优选包含两个或两个以上、或者 3 个或 3 个以上、或者 4 个或 4 个以上、或者 5 个或 5 个以上、或者所有 6 个 CDR 的高风险残基, 以及任选包含低或中等风险残基的一个或多个改变;

例如，包含低风险残基的一个或多个改变以及中等风险残基的保守取代，  
或

例如，保留中等风险和高风险氨基酸残基以及包含低风险残基的一个或多个改变，

其中改变包括插入、缺失或取代，可以是保守取代，或者改变可导致基因工程抗体在序列上更接近人轻链或重链序列、人种系轻链或重链序列、共有的人轻链或重链序列、或共有的人种系轻链或重链序列。本发明所包含的这种改变可以下面的序列格式展示。在一个假设的序列 AKKLVHPTYSFKEDF 中，根据 Studnicka 等，美国专利号 5,766,886 所述方法确定每一个残基的各自风险，那么序列可表示为 HMLHMLHMLHMLHML (H=高风险，M=中等风险，L=低风险)，假设序列中低风险残基的典型改变可表示为：AKXLVXTPXSFXEDX，其中 X 可以是任何氨基酸，或者 X 是该位置原始残基的保守取代，低风险和中等风险残基的典型改变也可以表示为，例如 AYXLYXTYXSXEYX，其中 X 是任何氨基酸，Y 是该位置原始残基的保守取代。

术语“竞争抗体”包括

1)经过 X 射线晶体学测定，与以下鼠抗体结合的 EphB3 表位相同的非鼠或非啮齿动物单克隆抗体：XHA.05.465、XHA.05.783、XHA.05.031、XHA.05.942、XHA.05.751、XHA.05.599、XPA.04.031、XPA.04.030、XPA.04.040、XHA.05.119、XHA.05.228、XHA.05.337、XHA.05.440、XPA.04.022、XHA.05.964、XHA.05.653、XHA.05.885、XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.036、XPA.04.046、XPA.04.048、XHA.05.660、XHA.05.552、XHA.05.949、XHA.05.151、XPA.04.019、XHA.05.676、XHA.05.030、XHA.05.200、XHA.05.005、XHA.05.001、XHA.05.888 或 XHA.05.111；和

2)与以下鼠抗体竞争超过 75%，超过 80%，或超过 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%或 95%的非鼠或非啮齿动物单克隆抗体：XHA.05.465、XHA.05.783、XHA.05.031、XHA.05.942、XHA.05.751、XHA.05.599、XPA.04.031、XPA.04.030、XPA.04.040、XHA.05.119、XHA.05.228、XHA.05.337、XHA.05.440、XPA.04.022、XHA.05.964、XHA.05.653、XHA.05.885、XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、

XPA.04.036、XPA.04.046、XPA.04.048、XHA.05.660、XHA.05.552、XHA.05.949、XHA.05.151、XPA.04.019、XHA.05.676、XHA.05.030、XHA.05.200、XHA.05.005、XHA.05.001、XHA.05.888 或 XHA.05.111。

本发明抗体与 EphB3 的 ECD 结合的亲和力  $K_D$  优选为至少  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  或  $10^{-11}$  M 或更低，优选诱导受体磷酸化、寡聚化、内化、降解、信号转导和/或 EphB3 介导的细胞粘附。

任选是，在本申请的申请日之前公开的或在本申请的申请日之前递交的申请中所公开的任何嵌合、人或人源化抗体被排除在本发明的范围之外。

如本文所广泛定义的，“非啮齿类”单克隆抗体是指由啮齿类杂交瘤所产生的完整啮齿类单克隆抗体之外的任何抗体。因此，非啮齿类抗体特别包括而不仅限于啮齿类抗体的突变体、啮齿类抗体片段、线性抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人工程化™抗体和人抗体，其中包括利用转基因动物或通过噬菌体展示技术制备的人抗体。同样，非小鼠抗体包括而不仅限于小鼠抗体的突变体、小鼠抗体片段、线性抗体、嵌合的、人源化的、人工程化™和人的抗体。

### **靶抗原**

可用于制备抗体的靶抗原可以是，例如，EphB3 的胞外域或保留所需表位的 EphB3 片段，任选是与另一多肽融合在一起，这种多肽可使表位以其天然构型展示。另外，细胞表面表达的完整 EphB3 可用于制备抗体。这种细胞可能经转化表达 EphB3 或者可以是另一种表达 EphB3 的天然细胞。本领域的技术人员了解可用于制备抗体的其他形式的 EphB3 多肽。

在一个实施方式中，本发明抗体结合 EphB3 的表位，其中所述表位选自表 1 所列的 SEQ ID NO: 11-421。在一些实施方式中，所述结构域选自配体结合域(SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基 39-212)、TNFR 结构域(SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基 256-331)、第一纤连蛋白结构域(SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基 340-435)或第二纤连蛋白结构域 (SEQ ID NO: 2 的氨基酸残基 453-535)。在一些实施方式中，本发明抗体结合于 EphB3 的配体结合域的表位，所述表位选自 SEQ ID NO: 11-145。在一些实施方式中，本发明抗体结合于 EphB3 的 TNFR 结构域的表位，所述表位选自 SEQ ID NO: 161-259。在一些实施方式中，本发明抗体结

合于 EphB3 的第一纤连蛋白结构域的表位，所述表位选自 SEQ ID NO: 259-301。在一些实施方式中，本发明抗体结合于 EphB3 的第二纤连蛋白结构域的表位，所述表位选自 SEQ ID NO: 380-421。

下表 1 提供 EphB3 (SEQ ID NO:2)中已鉴定为适合抗 EphB3 抗体识别的线性表位的区域。

表 1

作图区域(aa)	表位长度	表位	aa 序列位置	表位#	SEQ ID NO:
98-115	8-聚体	WRRDVQRV	98-105	1	11
98-115	8-聚体	RRDVQRVY	99-106	2	12
98-115	8-聚体	RDVQRVYV	100-107	3	13
98-115	8-聚体	DVQRVYVE	101-108	4	14
98-115	8-聚体	VQRVYVEL	102-109	5	15
98-115	8-聚体	QRVYVELK	103-110	6	16
98-115	8-聚体	RVYVELKF	104-111	7	17
98-115	8-聚体	VYVELKFT	105-112	8	18
98-115	8-聚体	YVELKFTV	106-113	9	19
98-115	8-聚体	VELKFTVR	107-114	10	20
98-115	8-聚体	ELKFTVRD	108-115	11	21
98-115	9-聚体	WRRDVQRVY	98-106	12	22
98-115	9-聚体	RRDVQRVYV	99-107	13	23
98-115	9-聚体	RDVQRVYVE	100-108	14	24
98-115	9-聚体	DVQRVYVEL	101-109	15	25
98-115	9-聚体	VQRVYVELK	102-110	16	26
98-115	9-聚体	QRVYVELKF	103-111	17	27
98-115	9-聚体	RVYVELKFT	104-112	18	28
98-115	9-聚体	VYVELKFTV	105-113	19	29
98-115	9-聚体	YVELKFTVR	106-114	20	30
98-115	9-聚体	VELKFTVRD	107-115	21	31
98-115	10-聚体	WRRDVQRVYV	98-107	22	32
98-115	10-聚体	RRDVQRVYVE	99-108	23	33
98-115	10-聚体	RDVQRVYVEL	100-109	24	34
98-115	10-聚体	DVQRVYVELK	101-110	25	35
98-115	10-聚体	VQRVYVELKF	102-111	26	36
98-115	10-聚体	QRVYVELKFT	103-112	27	37
98-115	10-聚体	RVYVELKFTV	104-113	28	38
98-115	10-聚体	VYVELKFTVR	105-114	29	39
98-115	10-聚体	YVELKFTVRD	106-115	30	40
152-194	8-聚体	NPYVKVDT	152-159	1	41
152-194	8-聚体	PYVKVDTI	153-160	2	42

152-194	8-聚体	YVKVDTIA	154-161	3	43
152-194	8-聚体	VKVDTIAP	155-162	4	44
152-194	8-聚体	KVDTIAPD	156-163	5	45
152-194	8-聚体	VDTIAPDE	157-164	6	46
152-194	8-聚体	DTIAPDES	158-165	7	47
152-194	8-聚体	TIAPDESF	159-166	8	48
152-194	8-聚体	IAPDESFS	160-167	9	49
152-194	8-聚体	APDESFSR	161-168	10	50
152-194	8-聚体	PDESFSRL	162-169	11	51
152-194	8-聚体	DESFSRLD	163-170	12	52
152-194	8-聚体	ESFSRLDA	164-171	13	53
152-194	8-聚体	SFSRLDAG	165-172	14	54
152-194	8-聚体	FSRLDAGR	166-173	15	55
152-194	8-聚体	SRLDAGRV	167-174	16	56
152-194	8-聚体	RLDAGRVM	168-175	17	57
152-194	8-聚体	LDAGRVT	169-176	18	58
152-194	8-聚体	DAGRVTNK	170-177	19	59
152-194	8-聚体	AGRVNTKV	171-178	20	60
152-194	8-聚体	GRVNTKVR	172-179	21	61
152-194	8-聚体	RVNTKQRS	173-180	22	62
152-194	8-聚体	VNTKQRSF	174-181	23	63
152-194	8-聚体	NTKQRSFG	175-182	24	64
152-194	8-聚体	TKQRSFGP	176-183	25	65
152-194	8-聚体	KQRSFGPL	177-184	26	66
152-194	8-聚体	QRSFGPLS	178-185	27	67
152-194	8-聚体	RSGPLSK	179-186	28	68
152-194	8-聚体	SFGPLSKA	180-187	29	69
152-194	8-聚体	FGPLSKAG	181-188	30	70
152-194	8-聚体	GPLSKAGF	182-189	31	71
152-194	8-聚体	PLSKAGFY	183-190	32	72
152-194	8-聚体	LSKAGFYL	184-191	33	73
152-194	8-聚体	SKAGFYLA	185-192	34	74
152-194	8-聚体	KAGFYLAF	186-193	35	75
152-194	8-聚体	AGFYLAFQ	187-194	36	76
152-194	9-聚体	NPYVKVDTI	152-160	37	77
152-194	9-聚体	PYVKVDTIA	153-161	38	78
152-194	9-聚体	YVKVDTIAP	154-162	39	79
152-194	9-聚体	VKVDTIAPD	155-163	40	80
152-194	9-聚体	KVDTIAPDE	156-164	41	81
152-194	9-聚体	VDTIAPDES	157-165	42	82
152-194	9-聚体	DTIAPDESF	158-166	43	83



152-194	9-聚体	TIAPDESFS	159-167	44	84
152-194	9-聚体	IAPDESFSR	160-168	45	85
152-194	9-聚体	APDESFSRL	161-169	46	86
152-194	9-聚体	PDESFSRLD	162-170	47	87
152-194	9-聚体	DESFSRLDA	163-171	48	88
152-194	9-聚体	ESFSRLDAG	164-172	49	89
152-194	9-聚体	SFSRLDAGR	165-173	50	90
152-194	9-聚体	FSRLDAGR	166-174	51	91
152-194	9-聚体	SRLDAGR	167-175	52	92
152-194	9-聚体	RLDAGR	168-176	53	93
152-194	9-聚体	LDAGR	169-177	54	94
152-194	9-聚体	DAGR	170-178	55	95
152-194	9-聚体	AGR	171-179	56	96
152-194	9-聚体	GR	172-180	57	97
152-194	9-聚体	R	173-181	58	98
152-194	9-聚体	V	174-182	59	99
152-194	9-聚体	N	175-183	60	100
152-194	9-聚体	T	176-184	61	101
152-194	9-聚体	K	177-185	62	102
152-194	9-聚体	V	178-186	63	103
152-194	9-聚体	R	179-187	64	104
152-194	9-聚体	S	180-188	65	105
152-194	9-聚体	F	181-189	66	106
152-194	9-聚体	G	182-190	67	107
152-194	9-聚体	P	183-191	68	108
152-194	9-聚体	L	184-192	69	109
152-194	9-聚体	S	185-193	70	110
152-194	9-聚体	K	186-194	71	111
152-194	10-聚体	NPYVKVD	152-161	72	112
152-194	10-聚体	PYVKVD	153-162	73	113
152-194	10-聚体	YVKVD	154-163	74	114
152-194	10-聚体	VKVD	155-164	75	115
152-194	10-聚体	KVD	156-165	76	116
152-194	10-聚体	VD	157-166	77	117
152-194	10-聚体	DTIAPDESFS	158-167	78	118
152-194	10-聚体	TIAPDESFSR	159-168	79	119
152-194	10-聚体	IAPDESFSRL	160-169	80	120
152-194	10-聚体	APDESFSRLD	161-170	81	121
152-194	10-聚体	PDESFSRLDA	162-171	82	122
152-194	10-聚体	DESFSRLDAG	163-172	83	123
152-194	10-聚体	ESFSRLDAGR	164-173	84	124

152-194	10-聚体	SFSRLDAGRV	165-174	85	125
152-194	10-聚体	FSRLDAGRNV	166-175	86	126
152-194	10-聚体	SRLDAGRNVNT	167-176	87	127
152-194	10-聚体	RLDAGRNVNTK	168-177	88	128
152-194	10-聚体	LDAGRNVNTKV	169-178	89	129
152-194	10-聚体	DAGRNVNTKVR	170-179	90	130
152-194	10-聚体	AGRVNTKVR	171-180	91	131
152-194	10-聚体	GRVNTKVR	172-181	92	132
152-194	10-聚体	RVNTKVR	173-182	93	133
152-194	10-聚体	VNTKVR	174-183	94	134
152-194	10-聚体	NTKVR	175-184	95	135
152-194	10-聚体	TKVR	176-185	96	136
152-194	10-聚体	KVR	177-186	97	137
152-194	10-聚体	VRS	178-187	98	138
152-194	10-聚体	RS	179-188	99	139
152-194	10-聚体	S	180-189	100	140
152-194	10-聚体	FG	181-190	101	141
152-194	10-聚体	GPL	182-191	102	142
152-194	10-聚体	PL	183-192	103	143
152-194	10-聚体	LS	184-193	104	144
152-194	10-聚体	SK	185-194	105	145
244-256	8-聚体	NAVEVSVP	244-251	1	146
244-256	8-聚体	AVEVSVP	245-252	2	147
244-256	8-聚体	VEVSVP	246-253	3	148
244-256	8-聚体	EVSVP	247-254	4	149
244-256	8-聚体	VSV	248-255	5	150
244-256	8-聚体	SV	249-256	6	151
244-256	9-聚体	NAVEVSVP	244-252	7	152
244-256	9-聚体	AVEVSVP	245-253	8	153
244-256	9-聚体	VEVSVP	246-254	9	154
244-256	9-聚体	EVSVP	247-255	10	155
244-256	9-聚体	VSV	248-256	11	156
244-256	10-聚体	NAVEVSVP	244-253	12	157
244-256	10-聚体	AVEVSVP	245-254	13	158
244-256	10-聚体	VEVSVP	246-255	14	159
244-256	10-聚体	EVSVP	247-256	15	160
274-298	8-聚体	GHEPAAKE	274-281	1	161
274-298	8-聚体	HEPAAKES	275-282	2	162
274-298	8-聚体	EPAAKESQ	276-283	3	163
274-298	8-聚体	PAAKESQC	277-284	4	164
274-298	8-聚体	AAKESQCR	278-285	5	165

274-298	8-聚体	AKESQCRP	279-286	6	166
274-298	8-聚体	KESQCRPC	280-287	7	167
274-298	8-聚体	ESQCRPCP	281-288	8	168
274-298	8-聚体	SQCRPCPP	282-289	9	169
274-298	8-聚体	QCRPCPPG	283-290	10	170
274-298	8-聚体	CRPCPPGS	284-291	11	171
274-298	8-聚体	RPCPPGSY	285-292	12	172
274-298	8-聚体	PCPPGSYK	286-293	13	173
274-298	8-聚体	CPPGSYKA	287-294	14	174
274-298	8-聚体	PPGSYKAK	288-295	15	175
274-298	8-聚体	PGSYKAKQ	289-296	16	176
274-298	8-聚体	GSYKAKQG	290-297	17	177
274-298	8-聚体	SYKAKQGE	291-298	18	178
274-298	9-聚体	GHEPAAKES	274-282	19	179
274-298	9-聚体	HEPAAKESQ	275-283	20	180
274-298	9-聚体	EPAAKESQC	276-284	21	181
274-298	9-聚体	PAAKESQCR	277-285	22	182
274-298	9-聚体	AAKESQCRP	278-286	23	183
274-298	9-聚体	AKESQCRPC	279-287	24	184
274-298	9-聚体	KESQCRPCP	280-288	25	185
274-298	9-聚体	ESQCRPCPP	281-289	26	186
274-298	9-聚体	SQCRPCPPG	282-290	27	187
274-298	9-聚体	QCRPCPPGS	283-291	28	188
274-298	9-聚体	CRPCPPGSY	284-292	29	189
274-298	9-聚体	RPCPPGSYK	285-293	30	190
274-298	9-聚体	PCPPGSYKA	286-294	31	191
274-298	9-聚体	CPPGSYKAK	287-295	32	192
274-298	9-聚体	PPGSYKAKQ	288-296	33	193
274-298	9-聚体	PGSYKAKQG	289-297	34	194
274-298	9-聚体	GSYKAKQGE	290-298	35	195
274-298	10-聚体	GHEPAAKESQ	274-283	36	196
274-298	10-聚体	HEPAAKESQC	275-284	37	197
274-298	10-聚体	EPAAKESQCR	276-285	38	198
274-298	10-聚体	PAAKESQCRP	277-286	39	199
274-298	10-聚体	AAKESQCRPC	278-287	40	200
274-298	10-聚体	AKESQCRPCP	279-288	41	201
274-298	10-聚体	KESQCRPCPP	280-289	42	202
274-298	10-聚体	ESQCRPCPPG	281-290	43	203
274-298	10-聚体	SQCRPCPPGS	282-291	44	204
274-298	10-聚体	QCRPCPPGSY	283-292	45	205
274-298	10-聚体	CRPCPPGSYK	284-293	46	206

274-298	10-聚体	RPCPPGSYKA	285-294	47	207
274-298	10-聚体	PCPPGSYKAK	286-295	48	208
274-298	10-聚体	CPPGSYKAKQ	287-296	49	209
274-298	10-聚体	PPGSYKAKQG	288-297	50	210
274-298	10-聚体	PGSYKAKQGE	289-298	51	211
313-336	8-聚体	PAASICTC	313-320	1	212
313-336	8-聚体	AASICTCH	314-321	2	213
313-336	8-聚体	ASICTCHN	315-322	3	214
313-336	8-聚体	SICTCHNN	316-323	4	215
313-336	8-聚体	ICTCHNNF	317-324	5	216
313-336	8-聚体	CTCHNNFY	318-325	6	217
313-336	8-聚体	TCHNNFYR	319-326	7	218
313-336	8-聚体	CHNNFYRA	320-327	8	219
313-336	8-聚体	HNNFYRAD	321-328	9	220
313-336	8-聚体	NNFYRADS	322-329	10	221
313-336	8-聚体	NFYRADSD	323-330	11	222
313-336	8-聚体	FYRADSDS	324-331	12	223
313-336	8-聚体	YRADSDSA	325-332	13	224
313-336	8-聚体	RADSDSAD	326-333	14	225
313-336	8-聚体	ADSDSADS	327-334	15	226
313-336	8-聚体	DSDSADSA	328-335	16	227
313-336	8-聚体	SDSADSAC	329-336	17	228
313-336	9-聚体	PAASICTCH	313-321	18	229
313-336	9-聚体	AASICTCHN	314-322	19	230
313-336	9-聚体	ASICTCHNN	315-323	20	231
313-336	9-聚体	SICTCHNNF	316-324	21	232
313-336	9-聚体	ICTCHNNFY	317-325	22	233
313-336	9-聚体	CTCHNNFYR	318-326	23	234
313-336	9-聚体	TCHNNFYRA	319-327	24	235
313-336	9-聚体	CHNNFYRAD	320-328	25	236
313-336	9-聚体	HNNFYRADS	321-329	26	237
313-336	9-聚体	NNFYRADSD	322-330	27	238
313-336	9-聚体	NFYRADSDS	323-331	28	239
313-336	9-聚体	FYRADSDSA	324-332	29	240
313-336	9-聚体	YRADSDSAD	325-333	30	241
313-336	9-聚体	RADSDSADS	326-334	31	242
313-336	9-聚体	ADSDSADSA	327-335	32	243
313-336	9-聚体	DSDSADSAC	328-336	33	244
313-336	10-聚体	PAASICTCHN	313-322	34	245
313-336	10-聚体	AASICTCHNN	314-323	35	246
313-336	10-聚体	ASICTCHNNF	315-324	36	247

313-336	10-聚体	SICTCHNNFY	316-325	37	248
313-336	10-聚体	ICTCHNNFYR	317-326	38	249
313-336	10-聚体	CTCHNNFYRA	318-327	39	250
313-336	10-聚体	TCHNNFYRAD	319-328	40	251
313-336	10-聚体	CHNNFYRADS	320-329	41	252
313-336	10-聚体	HNNFYRADSD	321-330	42	253
313-336	10-聚体	NNFYRADSDS	322-331	43	254
313-336	10-聚体	NFYRADSDSA	323-332	44	255
313-336	10-聚体	FYRADSDSAD	324-333	45	256
313-336	10-聚体	YRADSDSADS	325-334	46	257
313-336	10-聚体	RADSDSADSA	326-335	47	258
313-336	10-聚体	ADSDSADSAC	327-336	48	259
362-383	8-聚体	PRDLGGRD	362-369	1	260
362-383	8-聚体	RDLGGRDD	363-370	2	261
362-383	8-聚体	DLGGRDDL	364-371	3	262
362-383	8-聚体	LGGRDDLL	365-372	4	263
362-383	8-聚体	GGRDDLLY	366-373	5	264
362-383	8-聚体	GRDDLLYN	367-374	6	265
362-383	8-聚体	RDDLLYNV	368-375	7	266
362-383	8-聚体	DDLLYNVI	369-376	8	267
362-383	8-聚体	DLLYNVIC	370-377	9	268
362-383	8-聚体	LLYNVICK	371-378	10	269
362-383	8-聚体	LYNVICKK	372-379	11	270
362-383	8-聚体	YNVICKKC	373-380	12	271
362-383	8-聚体	NVICKKCH	374-381	13	272
362-383	8-聚体	VICKKCHG	375-382	14	273
362-383	8-聚体	ICKKCHGA	376-383	15	274
362-383	9-聚体	PRDLGGRDD	362-370	16	275
362-383	9-聚体	RDLGGRDDL	363-371	17	276
362-383	9-聚体	DLGGRDDL	364-372	18	277
362-383	9-聚体	LGGRDDLLY	365-373	19	278
362-383	9-聚体	GGRDDLLYN	366-374	20	279
362-383	9-聚体	GRDDLLYNV	367-375	21	280
362-383	9-聚体	RDDLLYNVI	368-376	22	281
362-383	9-聚体	DDLLYNVIC	369-377	23	282
362-383	9-聚体	DLLYNVICK	370-378	24	283
362-383	9-聚体	LLYNVICKK	371-379	25	284
362-383	9-聚体	LYNVICKKC	372-380	26	285
362-383	9-聚体	YNVICKKCH	373-381	27	286
362-383	9-聚体	NVICKKCHG	374-382	28	287
362-383	9-聚体	VICKKCHGA	375-383	29	288

362-383	10-聚体	PRDLGGRDDL	362-371	30	289
362-383	10-聚体	RDLGGRDDL	363-372	31	290
362-383	10-聚体	DLGGRDDL	364-373	32	291
362-383	10-聚体	LGGRDDL	365-374	33	292
362-383	10-聚体	GGRDDL	366-375	34	293
362-383	10-聚体	GRDDL	367-376	35	294
362-383	10-聚体	RDDL	368-377	36	295
362-383	10-聚体	DDL	369-378	37	296
362-383	10-聚体	DL	370-379	38	297
362-383	10-聚体	L	371-380	39	298
362-383	10-聚体	Y	372-381	40	299
362-383	10-聚体	YN	373-382	41	300
362-383	10-聚体	NV	374-383	42	301
436-469	8-聚体	PLPPRYAA	436-443	1	302
436-469	8-聚体	LPPRYAAV	437-444	2	303
436-469	8-聚体	PPRYAAVN	438-445	3	304
436-469	8-聚体	PRYAAVNI	439-446	4	305
436-469	8-聚体	RYAAVNIT	440-447	5	306
436-469	8-聚体	YAAVNITT	441-448	6	307
436-469	8-聚体	AAVNITTN	442-449	7	308
436-469	8-聚体	AVNITTNQ	443-450	8	309
436-469	8-聚体	VNITTNQA	444-451	9	310
436-469	8-聚体	NITTNQAA	445-452	10	311
436-469	8-聚体	ITTNQAAP	446-453	11	312
436-469	8-聚体	TTNQAAPS	447-454	12	313
436-469	8-聚体	TNQAAPSE	448-455	13	314
436-469	8-聚体	NQAAPSEV	449-456	14	315
436-469	8-聚体	QAAPSEVP	450-457	15	316
436-469	8-聚体	AAPSEVPT	451-458	16	317
436-469	8-聚体	APSEVPTL	452-459	17	318
436-469	8-聚体	PSEVPTLR	453-460	18	319
436-469	8-聚体	SEVPTLRL	454-461	19	320
436-469	8-聚体	EVPTLRLH	455-462	20	321
436-469	8-聚体	VPTRLRLHS	456-463	21	322
436-469	8-聚体	PTLRLHSS	457-464	22	323
436-469	8-聚体	TLRLHSSS	458-465	23	324
436-469	8-聚体	LRLHSSSG	459-466	24	325
436-469	8-聚体	RLHSSSGS	460-467	25	326
436-469	8-聚体	LHSSSGSS	461-468	26	327
436-469	8-聚体	HSSSGSSL	462-469	27	328
436-469	9-聚体	PLPPRYAAV	436-444	28	329

436-469	9-聚体	LPPRYAAVN	437-445	29	330
436-469	9-聚体	PPRYAAVNI	438-446	30	331
436-469	9-聚体	PRYAAVNIT	439-447	31	332
436-469	9-聚体	RYAAVNITT	440-448	32	333
436-469	9-聚体	YAAVNITTN	441-449	33	334
436-469	9-聚体	AAVNITTNQ	442-450	34	335
436-469	9-聚体	AVNITTNQA	443-451	35	336
436-469	9-聚体	VNITTNQAA	444-452	36	337
436-469	9-聚体	NITTNQAAP	445-453	37	338
436-469	9-聚体	ITTNQAAPS	446-454	38	339
436-469	9-聚体	TTNQAAPSE	447-455	39	340
436-469	9-聚体	TNQAAPSEV	448-456	40	341
436-469	9-聚体	NQAAPSEVP	449-457	41	342
436-469	9-聚体	QAAPSEVPT	450-458	42	343
436-469	9-聚体	AAPSEVPTL	451-459	43	344
436-469	9-聚体	APSEVPTLR	452-460	44	345
436-469	9-聚体	PSEVPTLRL	453-461	45	346
436-469	9-聚体	SEVPTLRLH	454-462	46	347
436-469	9-聚体	EVPTLRLHS	455-463	47	348
436-469	9-聚体	VPTLRLHSS	456-464	48	349
436-469	9-聚体	PTLRLHSSS	457-465	49	350
436-469	9-聚体	TLRLHSSSG	458-466	50	351
436-469	9-聚体	LRLHSSSGS	459-467	51	352
436-469	9-聚体	RLHSSSGSS	460-468	52	353
436-469	9-聚体	LHSSSGSSL	461-469	53	354
436-469	10-聚体	PLPPRYAAVN	436-445	54	355
436-469	10-聚体	LPPRYAAVNI	437-446	55	356
436-469	10-聚体	PPRYAAVNIT	438-447	56	357
436-469	10-聚体	PRYAAVNITT	439-448	57	358
436-469	10-聚体	RYAAVNITTN	440-449	58	359
436-469	10-聚体	YAAVNITTNQ	441-450	59	360
436-469	10-聚体	AAVNITTNQA	442-451	60	361
436-469	10-聚体	AVNITTNQAA	443-452	61	362
436-469	10-聚体	VNITTNQAAP	444-453	62	363
436-469	10-聚体	NITTNQAAPS	445-454	63	364
436-469	10-聚体	ITTNQAAPSE	446-455	64	365
436-469	10-聚体	TTNQAAPSEV	447-456	65	366
436-469	10-聚体	TNQAAPSEVP	448-457	66	367
436-469	10-聚体	NQAAPSEVPT	449-458	67	368
436-469	10-聚体	QAAPSEVPTL	450-459	68	369
436-469	10-聚体	AAPSEVPTLR	451-460	69	370

436-469	10-聚体	APSEVPTLRL	452-461	70	371
436-469	10-聚体	PSEVPTLRLH	453-462	71	372
436-469	10-聚体	SEVPTLRLHS	454-463	72	373
436-469	10-聚体	EVPTLRLHSS	455-464	73	374
436-469	10-聚体	VPTLRLHSSS	456-465	74	375
436-469	10-聚体	PTLRLHSSSG	457-466	75	376
436-469	10-聚体	TLRLHSSSGS	458-467	76	377
436-469	10-聚体	LRLHSSSGSS	459-468	77	378
436-469	10-聚体	RLHSSSGSSL	460-469	78	379
509-530	8-聚体	QLDGLRPD	509-516	1	380
509-530	8-聚体	LDGLRPDA	510-517	2	381
509-530	8-聚体	DGLRPDAR	511-518	3	382
509-530	8-聚体	GLRPDARY	512-519	4	383
509-530	8-聚体	LRPDARYV	513-520	5	384
509-530	8-聚体	RPDARYVV	514-521	6	385
509-530	8-聚体	PDARYVVQ	515-522	7	386
509-530	8-聚体	DARYVVQV	516-523	8	387
509-530	8-聚体	ARYVVQVR	517-524	9	388
509-530	8-聚体	RYVVQVRA	518-525	10	389
509-530	8-聚体	YVVQVRAR	519-526	11	390
509-530	8-聚体	VVQVRART	520-527	12	391
509-530	8-聚体	VQVRARTV	521-528	13	392
509-530	8-聚体	QVRARTVA	522-529	14	393
509-530	8-聚体	VRARTVAG	523-530	15	394
509-530	9-聚体	QLDGLRPDA	509-517	16	395
509-530	9-聚体	LDGLRPDAR	510-518	17	396
509-530	9-聚体	DGLRPDARY	511-519	18	397
509-530	9-聚体	GLRPDARYV	512-520	19	398
509-530	9-聚体	LRPDARYVV	513-521	20	399
509-530	9-聚体	RPDARYVVQ	514-522	21	400
509-530	9-聚体	PDARYVVQV	515-523	22	401
509-530	9-聚体	DARYVVQVR	516-524	23	402
509-530	9-聚体	ARYVVQVRA	517-525	24	403
509-530	9-聚体	RYVVQVRAR	518-526	25	404
509-530	9-聚体	YVVQVRART	519-527	26	405
509-530	9-聚体	VVQVRARTV	520-528	27	406
509-530	9-聚体	VQVRARTVA	521-529	28	407
509-530	9-聚体	QVRARTVAG	522-530	29	408
509-530	10-聚体	QLDGLRPDAR	509-518	30	409
509-530	10-聚体	LDGLRPDARY	510-519	31	410
509-530	10-聚体	DGLRPDARYV	511-520	32	411



509-530	10-聚体	GLRPDARYVV	512-521	33	412
509-530	10-聚体	LRPDARYVVQ	513-522	34	413
509-530	10-聚体	RPDARYVVQV	514-523	35	414
509-530	10-聚体	PDARYVVQVR	515-524	36	415
509-530	10-聚体	DARYVVQVRA	516-525	37	416
509-530	10-聚体	ARYVVQVRAR	517-526	38	417
509-530	10-聚体	RYVVQVRART	518-527	39	418
509-530	10-聚体	YVVQVRARTV	519-528	40	419
509-530	10-聚体	VVQVRARTVA	520-529	41	420
509-530	10-聚体	VQVRARTVAG	521-530	42	421

### 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过多点皮下注射(sc)或腹膜内注射(ip)相关抗原和佐剂在动物内制备。通过将相关抗原连接到在被免疫的物种内具有免疫原性的蛋白质上可以提高抗体反应,这种蛋白质的例子有钥孔虫戚血蓝素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或利用双功能或衍生试剂的大豆胰蛋白酶抑制剂,例如马来酰亚氨基苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基连接)、N 羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐或本领域已知的其他试剂。

动物用抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫,例如,100 µg 或 5 µg 蛋白或偶联物(分别用于兔或小鼠)和 3 倍体积的完全福氏佐剂混合,然后将溶液皮内注射到多个位点。一个月后通过多个位点皮下注射初始量 1/5 到 1/10 的完全福氏佐剂溶解的肽或偶联物对动物进行加强免疫。加强免疫后 7-14 天动物放血,分析血清中抗体的滴度。动物再次加强免疫直到滴度达到平台期。优选的,动物用相同抗原的偶联物加强免疫,但是也可以用连接到不同蛋白和/或通过不同交联剂连接的偶联物进行加强免疫。偶联物还可以融合蛋白的形式在重组细胞培养物中制备。另外,凝集试剂如明矾也适合用于增强免疫反应。

### 单克隆抗体

单克隆抗体可利用 Kohler 等, Nature, 256:495(1975)所描述的杂交瘤方法或重组 DNA 方法制备。

在杂交瘤方法中,按照本文所述免疫小鼠或其他合适的宿主动物如仓鼠或猕猴以刺激能够产生抗体的淋巴细胞,其中的抗体可与用于免疫的蛋白特异性

结合。另外，也可在体外免疫淋巴细胞。然后利用合适的融合试剂如聚乙二醇使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞(Goding, 《单克隆抗体：原理与实践》(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice), 59-103 页 学术出版社(Academic Press), 1986)。

因此，杂交瘤细胞可接种到合适的培养基中并在其中生长，培养基内优选含有一种或多种能抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如，如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT 或 HPRT)，则杂交瘤的培养基内通常包含次黄嘌呤、氨嘌呤和胸苷(HAT 培养基)，这些物质可阻止 HPGRT 缺失细胞的生长。

优选的骨髓瘤细胞是那些可有效融合并支持所筛选出的抗体产生细胞稳定高水平生产抗体，并且对培养基敏感的细胞。有报道证实人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系也可用于制备人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:3001(1984), Brodeur 等, 《单克隆抗体制备技术和应用》(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications), 51-63 页(纽约 MD 公司(Marcel Dekker, Inc., New York), 1987))。典型的小鼠骨髓瘤细胞系包括来源于美国加州圣迭戈的索尔克细胞分销中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA)保存的 MOP-21 和 M.C.-11 小鼠肿瘤的那些细胞系以及来源于美国马里兰州洛可维尔的美国典型培养物保藏中心(Rockville, Md. USA)保存的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞的那些细胞系。

分析培养杂交瘤细胞的培养基以检测直接抗抗原的单克隆抗体的产生情况。优选的是，杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合分析如放免分析(RIA)或酶联免疫吸附分析(ELISA)来确定。单克隆抗体的结合亲和力可以通过，例如，Scatchard 分析(Munson 等, Anal. Biochem., 107:220(1980))来确定。

当确定杂交瘤细胞可以产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体以后，杂交瘤细胞克隆可通过有限稀释方法进行亚克隆并通过标准方法培养(Goding, 《单克隆抗体：原理与实践》(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice), 59-103 页(学术出版社, 1986))。适用于此目的的培养基包括，例如，DMEM 或 RPMI-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞可作为动物体内的腹水瘤在

体内培养。亚克隆分泌的单克隆抗体适于通过常规的免疫球蛋白纯化方法如蛋白 A-琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析方法从培养基、腹水或血清中分离。

利用常规方法(例如, 利用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链基因的寡核苷酸探针)可以从杂交瘤细胞中分离编码单克隆抗体的 DNA 并测序。确定序列通常需要分离目的基因或 cDNA 的至少一部分。这通常需要克隆编码单克隆抗体的 DNA 或优选的 mRNA(即, cDNA)。克隆可利用标准技术(参见, 例如, Sambrook 等, (1989), 《分子克隆: 实验室指导》(Molecular Cloning: A Laboratory Guide), 1-3 卷, 冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press), 本文已纳入作为参考)完成。例如, 通过反转录聚 A+ mRNA 构建 cDNA 文库, 优选膜相关的 mRNA, 利用人免疫球蛋白多肽基因序列特异性的探针筛选文库。但是, 在一个优选实施方式中, 聚合酶链式反应(PCR)用于扩增编码目的免疫球蛋白基因片段(例如, 轻链可变区片段)的 cDNA(或全长 cDNA 的一部分)。扩增出的序列可以很容易地克隆到任何合适的载体如表达载体、微基因载体或噬菌体展示载体内。应当理解的是, 所使用的特定方法不是关键的因素, 只要有可能确定目的免疫球蛋白多肽的某些部分的序列就可以。在本文中, “分离”核酸分子或“分离”核酸序列是指(1)从至少一种污染核酸分子中鉴定和分离出来的核酸分子, 在核酸的天然资源中核酸分子通常与该污染的核酸分子相关联, 或者(2)从背景核酸中克隆、扩增、标记或区分出来的核酸分子, 这样目的核酸序列可以被确定, 这些核酸分子被认为是分离的。分离核酸分子所具有的形式或所处的环境在自然条件下是不存在的。因此, 分离核酸分子与天然细胞中存在的核酸分子是有区别的。但是, 分离核酸分子也包括通常表达抗体的细胞中所包含的核酸分子, 例如, 其中核酸分子在染色体上的位置与其在天然细胞中所处的位置不同。

用于克隆和测序的 RNA 的一个来源是通过获取转基因小鼠的 B 细胞并使其与永生细胞融合而制备的杂交瘤。使用杂交瘤的一个优点在于它们易于筛选, 可以筛选出能产生人目的单克隆抗体的杂交瘤。另外, RNA 可从免疫动物的 B 细胞(或全脾)中分离。如果使用杂交瘤之外的资源, 比较理想的是筛选具有特异性结合特征的免疫球蛋白或免疫球蛋白多肽编码序列。完成这种筛选

的一种方法是利用噬菌体展示技术。噬菌体展示技术见于，例如，Dower 等，WO 91/17271, McCafferty 等，WO 92/01047 以及 Caton 和 Koprowski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6450-6454(1990)的描述，本文都已纳入作为参考。在使用噬菌体展示技术的一个实施方式中，从免疫的转基因小鼠中分离 cDNA(例如，脾总 cDNA)，利用聚合酶链式反应扩增编码部分免疫球蛋白多肽如 CDR 的 cDNA 序列，然后将扩增出的序列插入到噬菌体载体内。利用标准技术如淘洗技术鉴定编码目的肽如具有理想结合特征的可变区肽的 cDNA。

然后测定扩增的或克隆的核酸的序列。一般情况下要测定编码免疫球蛋白多肽的完整可变区的序列，但是有时只测定一部分可变区如 CDR 编码区就足够了。通常测序的部分至少有 30 个碱基长，更常见的是要测定编码可变区的至少约 1/3 或至少约一半的序列。

测序可在分离自 cDNA 文库的克隆上进行，或者，当使用 PCR 时，可在将扩增的序列亚克隆后进行测序，或者直接通过 PCR 测定扩增片段的序列。测序可用标准技术完成(参见，例如，Sambrook 等，(1989)，《分子克隆：实验室指导》(Molecular Cloning: A Laboratory Guide)，1-3 卷，冷泉港出版社，以及 Sanger, F.等，(1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467，本文已纳入作为参考)。通过比较克隆的核酸序列与已公开的人免疫球蛋白基因和 cDNA 序列，本领域的技术人员根据测序的区域可以很容易地确定(i)杂交瘤免疫球蛋白多肽的种系区段用途(其中包括重链的同种型)和(ii)重链和轻链可变区序列，其中包括 N 区添加和体细胞突变而产生的序列。免疫球蛋白基因序列信息的一个来源是位于马里兰州贝沙达的国立健康研究所的国家医学图书馆的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md)。

### 抗体片段

如上所述，抗体片段包括完整全长抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区或可变区，包括抗体片段形成的线性抗体和多特异性抗体。抗体片段的非限定性例子包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、Fd、域抗体(dAb)、补体决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、单链抗体片段、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、线性抗体、螯合的重组抗体、三抗体或双抗体、胞内抗体、纳米抗体、小模块

免疫药物(SMIP)、抗原结合区免疫球蛋白融合蛋白、骆驼化抗体、含 VHH 的抗体或其突变体或衍生物, 以及包含免疫球蛋白的至少一部分, 如 CDR 序列从而足以赋予多肽抗原结合特异性的多肽, 只要抗体保留所需的生物学活性。这种抗原片段可通过重组 DNA 技术或肽合成技术修饰全长抗体或从新合成来制备。

术语“双抗体”是指含有两个抗原结合位点的小抗体片段, 该片段包含一条与同一多肽链(VH VL)上的轻链可变区(VL)相连的重链可变区(VH)。由于所使用的接头太短使同一条链上的两个结构域之间无法配对, 因此这两个结构域被迫与另一条链上的互补区配对, 形成两个抗原结合位点。有关双抗体更全面的描述参见, 例如, EP 404,097; WO 93/11161; 以及 30 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448(1993)。

“单链 Fv”或“sFv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 VH 和 VL 区, 其中这些区存在于一条多肽链上, 任选是, Fv 多肽还包含位于 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 区之间的多肽接头, 这种接头可使 Fv 形成抗原结合所需的理想结构(Bird 等, *Science* 242:423-426, 1988, 以及 Huston 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883, 1988)。Fd 片段由 V<sub>H</sub> 和 C<sub>H1</sub> 区组成。

其他抗体片段包括由 V<sub>H</sub> 组成的域抗体(dAb)片段(Ward 等, *Nature* 341:544-546, 1989)。

“线性抗体”包含一对串联的 Fd 片段(V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>), 这些片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的, 也可以是单特异性的(Zapata 等, *Protein Eng.* 8:1057-62(1995))。

“微型抗体”包含 scFv 和 CH3, 二者由肽接头(无铰链)或 IgG 铰链连接在一起, 参见 Olafsen, 等, *Protein Eng Des Sel.* 2004 Apr;17(4):315-23 的描述。

缺少轻链的功能性重链抗体是由铰口鲨(Greenberg 等, *Nature* 374:168-73, 1995)、斑纹须鲨(Nuttall 等, *Mol Immunol.* 38:313-26, 2001)和骆驼科动物(Hamers-Casterman 等, *Nature* 363:446-8, 1993; Nguyen 等, *J. Mol. Biol.* 275:413, 1998)如骆驼、单峰骆驼、羊驼和美洲驼自然产生的。在这些动物中, 抗原结合位点缩减到单个结构域-VH<sub>H</sub> 区。这些抗体只利用重链可变区就可以形成抗原结合区, 即, 这些功能性抗体是只具有 H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> 结构的重链形成的同源二聚体(被

称为“重链抗体”或“HCAb”)。据报道,骆驼化(Camelized) $V_{HH}$ 可与包含铰链区、CH2和CH3区但缺少CH1区的IgG2和IgG3恒定区重组(Hamers-Casterman等,同上)。例如,美洲驼IgG1是常规( $H_2L_2$ )抗体的同种型,其中 $V_H$ 与包含铰链区、CH1、CH2和CH3区的恒定区重组,而美洲驼IgG2和IgG3是只含重链的同种型,不含CH1区,也没有轻链。典型的只含 $V_H$ 的片段难以产生可溶性的形式,但是将框架区的残基改变成更类似 $V_{HH}$ 的残基可以提高其溶解度和特异性结合活性(参见,例如,Reichman等, *J Immunol Methods* 1999, 231:25-38)。研究发现,骆驼化 $V_{HH}$ 区可以很高的亲和力结合抗原(Desmyter等, *J. Biol. Chem.* 276:26285-90, 2001),并且在溶液中非常稳定(Ewert等, *Biochemistry* 41:3628-36, 2002)。制备具有骆驼化重链的抗体的方法参见,例如,美国专利出版号20050136049和20050037421的描述。

由于重链抗体的可变区是最小的全功能抗原结合片段,分子量只有15 kDa,因此这个分子被称为纳米抗体(Cortez-Retamozo等, *Cancer Research* 64:2853-57, 2004)。纳米抗体库是从免疫的单峰骆驼中制备的,如Conrath等, (*Antimicrob Agents Chemother* 45:2807-12, 2001)所述,或者是利用重组方法制备的,如所述。

胞内抗体是被证明在细胞内表达并且能调控细胞内蛋白功能的单链抗体(Biocca等, *EMBO J.* 9:101-108, 1990; Colby等, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:17616-21, 2004)。胞内抗体包含细胞信号序列,这个序列的功能在于维持抗体在胞内区的结构,其制备方法可参见Mhashilkar等(*EMBO J* 14:1542-51, 1995)和Wheeler等(*FASEB J.* 17:1733-5, 2003)。转运体(Transbody)是可透过细胞的抗体,其中蛋白转导区(PTD)与单链可变区片段(scFv)抗体融合在一起,Heng等, (*Med Hypotheses.* 64:1105-8, 2005)。

本发明还涉及的抗体包括SMIP或靶蛋白特异性的结合区免疫球蛋白融合蛋白。这些构建体是包含抗原结合区的单链多肽,其中抗原结合区融合到执行抗体效应功能所必须的免疫球蛋白区域上。参见,例如,WO03/041600,美国专利出版号20030133939和美国专利出版号20030118592。

### 多价抗体

在某些实施方式中,比较理想的是制备多价单克隆抗体,甚至多特异性(例

如，双特异性、三重特异性等)单克隆抗体。这种抗体对靶抗原的至少两个不同表位具有结合特异性，或者可以结合两个不同的分子，例如，靶抗原和细胞表面蛋白或受体。例如，双特异性抗体可包含一个结合靶抗原的臂和另一个结合白细胞上的激发分子如 T 细胞受体分子(例如，CD2 或 CD3)或 IgG 的 Fc 受体(Fc $\gamma$ R)如 Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RII(CD32)和 Fc $\gamma$ RIII(CD16)从而将细胞防御机制集中到表达靶抗原的细胞上的臂。作为另一个例子，双特异性抗体可用于将细胞毒药物定位到表达靶抗原的细胞上。这些抗体包含靶抗原结合臂和结合细胞毒药物(例如，皂草素、抗干扰素-60、长春花碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。多特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段。

双特异性抗体包括交联或“异源聚合”的抗体。例如，异源聚合物中的一个抗体可与链亲和素偶联，另一个与生物素结合。异源聚合物抗体可用任何方便的交联方法制备。合适的交联剂是本领域熟知的，在美国专利号 4,676,980 中有描述，其中还包括多种交联技术。

根据制备双特异性抗体的另一种方法，一对抗体分子之间的界面可以被改造以使从重组细胞培养物中回收的异源二聚体所占百分率达到最高。优选的界面包含抗体恒定区 C<sub>H</sub>3 区的至少一部分。在这种方法中，来自于第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大的侧链取代(如，酪氨酸或色氨酸)。用较小的氨基酸侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代大的氨基酸侧链会在第二抗体分子的界面上产生相同或相似尺寸侧链对大侧链的补偿“空洞”。这为提高杂合二聚体的产率使其超过其他不需要的终产物如同源二聚体提供了一个机制。参见 1996 年 9 月 6 日出版的 WO96/27011。

利用抗体片段制备双特异性抗体的技术也可见于文献的描述。例如，可以利用化学连接的方法制备双特异性抗体。Brennan 等，*Science*, 229:81(1985)描述了一种方法，其中完整抗体通过蛋白酶裂解制备出 F(ab')<sub>2</sub> 片段。这些片段在二巯基复合试剂亚砷酸钠存在的条件下被还原以稳定连位二巯基化合物，防止分子间二硫键形成。产生出的 Fab' 片段再被转化成硫代硝基苯甲酸(thionitrobenzoate)(TNB)衍生物。一个 Fab'-TNB 衍生物通过与巯基乙胺的还原反应再转化成 Fab'-巯基，与等摩尔的其他 Fab'-TNB 衍生物混合形成双特异性抗体。所制备出的双特异性抗体可作为试剂用于特异性地固化酶。Better 等，

Science 240:1041-1043(1988)描述了功能性抗体片段从细菌中的分泌(参见, 例如 Better 等, Skerra 等, Science 240:1038-1041(1988))。例如, Fab'-SH 片段可直接从大肠杆菌回收, 该片段通过化学方法偶联可形成双特异性抗体。(Carter 等, Bio/Technology 10:163-167(1992); Shalaby 等, J. Exp. Med. 175:217-225(1992))。

Shalaby 等, J. Exp. Med., 175:217-225(1992)描述了完全人源化的双特异性抗体  $F(ab')_2$  分子的制备方法。每一种 Fab' 片段都独自从大肠杆菌中分泌, 在体外经过直接化学偶联后形成双特异性抗体。因此所形成的双特异性抗体能够结合过量表达 HER2 受体的细胞和正常的人 T 细胞, 并且能够激发人细胞毒淋巴细胞抗人乳腺肿瘤靶位的溶解活性。

直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术也已有报道。例如, 利用亮氨酸拉链如 GCN4 可制备出双特异性抗体。(参见, Kostelny 等, J. Immunol., 148(5):1547-1553(1992)。来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合的方式连接到两个不同抗体的 Fab' 部分。抗体同源二聚体在铰链区被还原形成单体, 然后再氧化形成抗体异源二聚体。这种方法还被用于制备抗体同源二聚体。

术语“双抗体”是指含有两个抗原结合位点的小抗体片段, 该片段包含一条与同一多肽链(VH VL)上的轻链可变区(VL)相连的重链可变区(VH)。由于所使用的接头太短使同一条链上的两个结构域之间无法配对, 因此这两个结构域被迫与另一条链上的互补区配对, 形成两个抗原结合位点。参见, 例如, Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)。

制备双特异性抗体片段的另一种策略是利用单链  $Fv(sFv)$  二聚体, 参见 Gruber 等, J. Immunol. 152:5368(1994)。

另外, 双特异性抗体可以是“线性抗体”, 如 Zapata 等, Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995)所述的方法制备的线性抗体。简言之, 这些抗体包含一对串联的 Fd 片段( $V_H -C_{H1}-V_H -C_{H1}$ ), 这些片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的, 也可以是单特异性的。

本发明涉及二价以上的抗体。例如, 可以制备三重特异性抗体。Tutt 等, J. Immunol. 147:60(1991)。



“整合重组抗体”是可识别靶抗原上相邻而非重叠表位的双特异性抗体，这种抗体的柔软程度足以使其同时结合两个表位(Neri 等, *J Mol Biol.* 246:367-73, 1995)。

双特异性 Fab-scFv(“双抗体”)和三重特异性 Fab-(scFv)(2)(“三抗体”)的制备方法见于 Schoonjans 等, (*J Immunol.* 165:7050-57, 2000)和 Willems 等, (*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786:161-76, 2003)的描述。在双抗体或三抗体中, scFv 分子融合到 VL-CL(L)和 VH-CH<sub>1</sub>(Fd)链中的一个或两个上, 例如, 在三抗体中, 两个 scFv 融合到 Fab 的 C 区, 而在双抗体中, 一个 scFv 融合到 Fab 的 C 区。

### 抗体的重组制备方法

抗体可利用本领域熟知的一种抗体表达系统通过重组 DNA 方法制备(参见, 例如, Harlow 和 Lane 《抗体: 实验室操作手册》(Antibodies:A Laboratory Manual), 冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory) (1988))。

编码本发明抗体的 DNA 可被放置到表达载体内, 然后将表达载体转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、人胚胎肾 293 细胞(例如, 293E 细胞)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生其他免疫球蛋白的骨髓瘤细胞内, 从而在重组的宿主细胞内合成单克隆抗体。抗体的重组制备方法是本领域所熟知的。通过蛋白水解消化完整抗体可得到抗体片段(参见, 例如, Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992)和 Brennan 等, *Science* 229:81(1985))。但是, 现在这些片段可以由重组宿主细胞直接产生。制备抗体片段的其他技术, 其中包括肽合成技术和共价连接技术, 是技术人员所熟知的。

表达控制序列是指操作性连接的编码序列在特定宿主有机体内表达所必需的 DNA 序列。适用于原核细胞的控制序列包括例如, 启动子、任选操纵子序列以及核糖体结合位点。真核细胞已知利用启动子、多聚腺苷酸信号和增强子。

当核酸与另一种核酸序列处于功能性相互关系中时则核酸是操作性连接的。例如, 当前序列或分泌前导序列的 DNA 表达为参与多肽分泌的前蛋白时, 则该 DNA 与多肽的 DNA 操作性地连接; 当启动子或增强子可影响序列的转录时, 则该启动子或增强子与编码序列操作性地连接; 或者当核糖体结合位点

所处的位置能促进翻译时则该核糖体结合位点与编码序列操作性地连接。一般而言，操作性连接意味着被连接的 DNA 序列是连续的，以及在分泌前导序列中是连续的，并且处于阅读框中。然而，增强子不一定是连续的。在方便的限制性酶切位点上通过连接反应可完成连接。如果这样的位点不存在，那么可按照常规实验合成寡核苷酸衔接子或接头。

在本文中，细胞、细胞系和细胞培养物可交互使用，所有这些定义都包括子代细胞。转化子和转化细胞包括对象的原代细胞及其衍生的培养物，不论传代次数。还应当理解，子代细胞在 DNA 含量上不一定完全相同，因为存在有意或无意突变。在筛选原始转化细胞的过程中具有相同功能或生物活性的突变子代细胞也包括在该定义之内。如果意味着不同的含义，那么可以从上下文中看出来。

在另一个实施方式中，目的免疫球蛋白的氨基酸序列可通过蛋白直接测序来确定。可以根据通用密码表设计合适的编码核苷酸序列。

通过将合适的核苷酸改变引入到编码 DNA 内或者通过肽合成可以制备出理想抗体的氨基酸序列突变体。这种突变包括，例如，抗体的氨基酸序列内残基的缺失和/或插入和/或取代。缺失、插入和取代的任意组合都可使用以获得最后的构建体，只要最后的构建体具有理想的特征。氨基酸改变还可以改变单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、人工程化<sup>TM</sup>抗体或突变抗体的翻译后处理过程，例如改变糖基化位点的数目和位置。

编码抗体的氨基酸序列突变体的核酸分子可用本领域已知的各种方法制备。这些方法包括而限于从天然资源中分离(在出现天然氨基酸序列突变的情况下)或者通过寡核苷酸介导的(位点特异性的)突变、PCR 突变制备，以及盒式突变先前制备的突变体或抗体的非突变版本。

本发明还提供了编码本发明抗体的分离核酸，任选是核酸与控制序列操作性地连接，这些控制序列可被宿主细胞、载体和包含核酸的宿主细胞识别，以及制备抗体的重组技术，该技术包括培养宿主细胞以表达核酸，以及任选从宿主细胞培养物或培养基中回收抗体。

为了通过重组方法制备抗体，将编码抗体的核酸分离出来并插入到可复制载体内以便于进一步克隆(扩增 DNA)或表达。利用常规方法(例如，通过利用

能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)很容易分离和测序编码单克隆抗体的 DNA。许多载体都是可用的。载体一般包括而限于下列元件中的一个或多个: 信号序列、复制起始位点、一个或多个筛选标志基因、增强子元件、启动子以及转录终止序列。

### (1) 信号序列组件

本发明的抗体不仅可以通过重组方法直接制备,而且还可以通过与异源多肽形成融合多肽来制备,优选的是,位于成熟蛋白或多肽 N 末端的信号序列或其他多肽包含特异性裂解位点。所选择的异源信号序列优选能够被宿主细胞识别和处理(即,被信号肽酶裂解)的信号序列。对于不能识别和处理天然抗体信号序列的原核宿主细胞来说,信号序列可用所选择的信号序列取代,例如,来源于果胶酶(例如, *pelB*)、碱性磷酸酶、青霉素酶、*lpp* 或热稳定内毒素 II 前导子的信号序列。对于酵母分泌来说,天然信号序列可以被,例如,酵母转化酶前导子、 $\alpha$  因子前导子(包括酵母属和克鲁维酵母属  $\alpha$  因子前导子)或酸性磷酸酶前导子、白色念珠菌葡萄糖淀粉酶前导子或 WO 90/13646 所描述的信号所取代。在哺乳动物细胞表达中,可以使用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导子,如单纯疱疹 gD 信号。

编码这种前体区的 DNA 被连接到编码抗体的 DNA 的阅读框架内。

### (2) 复制起始位点组件

表达载体和克隆载体都包含能使载体在一种或多种特殊宿主细胞内复制的核酸序列。一般而言,在克隆载体内这个序列是能够使载体独立于宿主染色体 DNA 而复制的序列,其中包含复制起始位点或自主复制序列。许多细菌、酵母和病毒的这种序列都是已知的。质粒 *pBR322* 的复制起始位点适于大多数革兰氏阴性细菌,  $2\mu$  质粒起始位点适于酵母,各种病毒的起始位点适于哺乳动物细胞的克隆载体。通常来说,哺乳动物表达载体不需要复制起始位点元件(一般只使用 SV40 起始位点,因为它包含早期启动子)。

### (3) 筛选标记组件

表达载体和克隆载体可包含筛选基因,也被称为筛选标志。典型的筛选基因编码的蛋白质能够(a)赋予对抗生素或其他毒素如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤、四环素、G418、遗传霉素、组胺醇或霉酚酸的耐药性,(b)弥补营养缺

陷,或者(c)提供复合培养基中缺少的关键营养素,例如,编码 Bacilli D 丙氨酸消旋酶的基因。

筛选方法的一个例子是利用可以使宿主细胞生长停止的药物。成功转化外源基因的那些细胞可产生耐药性蛋白,因而可在选择培养基中存活下来。这种优势筛选的例子使用药物甲氨蝶呤、新霉素、组胺醇、嘌呤霉素、霉酚酸和潮霉素。

对于哺乳动物细胞来说,合适筛选标志物的另一个例子是那些能够用于鉴定细胞是否能够摄取抗体编码核酸的标志物,如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白-I 和-II,优选灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如,转化 DHFR 筛选基因的细胞首先通过在包含甲氨蝶呤(Mtx)的培养基内培养所有转化子来鉴定,其中甲氨蝶呤是 DHFR 的竞争性拮抗剂。如果使用野生型 DHFR,那么合适的宿主细胞是 DHFR 活性缺失的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

另外,转化或共转化编码本发明抗体、野生型 DHFR 蛋白以及其他筛选标志物如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶(APH)的 DNA 序列的宿主细胞(特别是包含内源性 DHFR 的野生型宿主细胞)也可以通过在含筛选标志物的筛选药物如氨基糖苷类抗生素如卡那霉素、新霉素或 G418 的培养基内培养来进行筛选。参见美国专利号 4,965,199。

适用于酵母的筛选基因是酵母质粒 YRp7 上存在的 *trp1* 基因(Stinchcomb 等, *Nature*, 282:39(1979))。*trp1* 基因可为不能在色氨酸中生长的酵母的突变株提供筛选标志物,例如, ATCC No. 44076 或 PEP4-1。Jones, *Genetics*, 85:12(1977)。因此,酵母宿主细胞基因组内存在的 *trp1* 损伤为检测转化提供了一个有效环境,其中酵母可在缺乏色氨酸的条件下生长。同样,缺乏 *Leu2* 的酵母细胞系(ATCC 20,622 或 38,626)可被已知的携带 *Leu2* 基因的质粒弥补。缺乏 *Ura3* 的酵母细胞系可被携带 *ura3* 基因的质粒弥补。

另外,衍生自 1.6 微米环状质粒 pKD1 的载体可用于转化克鲁维酵母。另外,利用乳酸克鲁维酵母表达系统大规模制备重组牛凝乳酶也已有报道。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135(1990)。文献还公开过利用稳定的多拷贝表达

载体和克鲁维酵母的工业化细胞系分泌成熟的重组人血清白蛋白。Fleer 等, Bio/Technology, 9:968-975(1991)。

#### (4) 启动子组件

表达和克隆载体一般都包含能被宿主有机体识别并与抗体编码核酸操作性连接的启动子。适用于原核宿主的启动子包括阿拉伯糖启动子(例如, araB)、phoA 启动子、 $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸(trp)启动子系统以及杂合启动子如 tac 启动子。但是其他已知的细菌启动子也可以使用。适用于细菌系统的启动子还包含与编码本发明抗体的 DNA 操作性连接的夏因-达尔加诺(S.D.)序列。

真核细胞的启动子序列是已知的。几乎所有的真核细胞基因都有 AT 富含区, 该区位于转录起始位点上游约 25 到 30 个碱基处。位于许多基因的转录起始位点上游 70 到 80 个碱基处的另一种序列是 CNCAAT 区, 其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3'末端是 AATAAA 序列, 这一序列可能是在编码序列 3'末端添加多聚腺苷酸尾巴的信号。所有这些序列都适于插入到真核表达载体内。

可用于酵母宿主的合适启动序列的例子包括 3-磷酸甘油酸激酶或其他酵解酶如烯醇化酶、3-磷酸甘油醛脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、三磷酸异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶的启动子。

其他酵母启动子包括乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、3-磷酸甘油醛脱氢酶以及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区, 这些启动子是可诱导启动子, 具有可通过培养条件控制转录的额外优势。适用于酵母表达的载体和启动子在 EP 73,657 中有进一步描述。酵母启动子优选与酵母增强子联合使用。

在哺乳动物宿主细胞内, 抗体从载体的转录是可控的, 例如, 通过病毒基因组来源的启动子以及哺乳动物异源启动子如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子、热休克蛋白启动子, 只要这种启动子与宿主细胞系统相容, 其中病毒的例子有艾贝尔逊(氏)白血病病毒、多瘤病毒、鸡痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头状瘤病毒、鸟类肉瘤病毒, 最优选的是巨细胞病毒、

逆转录病毒、乙型肝炎病毒、猿猴病毒 40(SV40)。

SV40 病毒的早期和晚期启动子作为 SV40 的限制性酶切片段可以很方便的获得, 其中还包含 SV40 的复制起始位点。人巨细胞病毒的立即早期启动子作为 Hind III E 限制性酶切片段可以很方便地获得。美国专利号 4,419,446 公开了利用牛乳头状瘤病毒为载体的在哺乳动物宿主内表达 DNA 的系统。美国专利号 4,601,978 描述了对该系统的修饰。也可参见 Reyes 等, *Nature* 297:598-601(1982)所描述的在单纯疱疹胸苷激酶启动子的控制之下人  $\beta$  干扰素 cDNA 在小鼠细胞内的表达。另外, 鲁斯氏肉瘤病毒长末端重复序列也可用作启动子。

#### (5) 增强子组件

通过在载体内插入增强子序列通常会增强编码本发明抗体的 DNA 在较高级的真核细胞内的转录。现在已知有许多哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)来源的增强子序列。但是, 人们通常使用真核细胞病毒来源的增强子。其中的例子包括位于复制起始位点后侧(100-270 bp)的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起始位点后侧的多瘤病毒增强子以及腺病毒增强子。也可参见 Yaniv, *Nature* 297:17-18(1982)所描述的用于活化真核启动子的增强子元件。增强子可被插入到载体内抗体编码序列的 3' 或 5' 位置, 但是优选位于启动子的 5' 位置。

#### (6) 转录终止组件

真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或其他多细胞有机体来源的有核细胞)所使用的表达载体还包含终止转录以及稳定 mRNA 所必需的序列。这种序列通常位于真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' 非翻译区, 偶尔也会位于 3' 非翻译区。这些区包含转录成多聚腺苷酸片段的核苷酸片段, 位于编码抗体的 mRNA 的非翻译部分内。一个有用的转录终止元件是牛生长激素多聚腺苷酸区。参见 WO94/11026 及其公开的表达载体。另一种是小鼠免疫球蛋白轻链转录终止子。

#### (7) 宿主细胞的筛选和转化

可用于克隆或表达本文所述的载体内的 DNA 的合适宿主细胞包括上述原核细胞、酵母或较高级的真核细胞。用于此目的合适原核细胞包括

真细菌，如革兰氏阴性或革兰氏阳性有机体，例如，肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 的细菌，如埃希氏杆菌属 (*Escherichia*) 的细菌如大肠杆菌 (*E. coli*)，肠道细菌属 (*Enterobacter*) 的细菌、欧文氏菌属 (*Erwinia*) 的细菌、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*) 的细菌、变形杆菌属 (*Proteus*) 的细菌、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 的细菌如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 的细菌如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*) 和志贺氏菌属 (*Shigella*) 的细菌，以及杆菌 (*Bacilli*) 如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如，1989年4月12日公开的 DD 266,710 所述的地衣芽孢杆菌)，假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的细菌如绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*)，和链霉菌属 (*Streptomyces*) 的细菌。一个优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC 31,446)，尽管其他株如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776 (ATCC 31,537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC 27,325) 也适用。这些实施例是说明性的，而不是限制性的。除了原核细胞以外，真核微生物如丝状真菌或酵母也是抗体编码载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母或常见的发面酵母是最常用的低级真核宿主微生物。但是，其他属、种和株也是常用的，也可用于本发明，如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*) 宿主如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)，脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)，保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)，韦氏克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)，瓦替克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)，果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906)，耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 以及马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*)；耶氏酵母 (*Yarrowia*) (EP 402,226)；毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070)；念珠菌属 (*Candida*)；木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*)；许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 如西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)；以及丝状真菌如链孢霉属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉 (*Tolyptocladium*)；以及曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*)。

适用于表达糖基化抗体的宿主细胞来源于多细胞生物。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。许多杆状病毒株及其突变株和来源于宿主如草地贪

夜蛾(毛虫)、埃及伊蚊(蚊子)、白纹伊蚊(蚊子)、黑腹果蝇(果蝇)和家蚕的相应昆虫允许宿主细胞都已被鉴定。用于转染的许多病毒株都是公开的,例如苜蓿银纹夜蛾 NPV 的 L-1 突变株和家蚕 NPV 的 Bm-5 株,这种病毒可用作本发发明的病毒,特别是用于转染草地贪夜蛾细胞。

棉花、玉米、土豆、大豆、牵牛花、西红柿、烟草、浮萍和其他植物细胞的培养物也可用作宿主。

但是,最感兴趣的是脊椎动物细胞,在培养物(组织培养物)中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规方法。可使用的哺乳动物细胞的例子有中国仓鼠卵巢细胞,其中包括 CHOK1 细胞(ATCC CCL61)、DXB-11、DG-44 和中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216(1980)); 转化 SV40 的猴肾 CV1 细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚胎肾细胞系(可在悬浮培养物中生长的 293 或 293 亚克隆细胞[Graham 等, *J. Gen Virol.*, 36:59(1977)]); 幼儿仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10); 小鼠塞尔托利氏细胞(IM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251(1980)); 猴肾细胞(CV1, ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34); 布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房肿瘤细胞系(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 细胞(Mather 等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68(1982)); MRC5 细胞; FS4 细胞; 以及人肝细胞瘤细胞系(Hep G2)。

宿主细胞可用上述表达或克隆载体转化用于制备抗体,并在常规的营养培养基中培养,培养基可加以调整以便于诱导启动子、筛选转化子或扩增编码目的序列的基因。另外,可通过筛选标志分离的新载体和用多个拷贝的转录单位转染的细胞系是特别有用的,优选用于表达抗体。

#### (8) 培养宿主细胞

用于制备本发明抗体的宿主细胞可在各种培养基内培养。商品化的培养基如 Ham's F10(西格玛公司(Sigma))、基本必需培养基(MEM)(西格玛公司)、RPMI-1640(西格玛公司)以及达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM, 西格玛公司)适用于培养宿主细胞。另外,Ham 等, *Meth. Enz.* 58:44(1979); Barnes 等,



Anal. Biochem. 102:255(1980); 美国申请号 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655 或 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或者美国专利登记号 30,985 所描述的培养基也可用于培养宿主细胞。所有这些培养基都必须添加激素和/或其他生长因子(例如,胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如,氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(例如,HEPES)、核苷酸(例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶)、抗生素(例如,庆大霉素药物)、微量元素(通常定义为最终浓度以微摩尔计的无机化合物)以及葡萄糖或等价的能量源。其他必需的添加物也可以适当的浓度添加,这是本领域技术人员所熟知的。培养条件如温度、pH 等为上面筛选宿主细胞表达时所用的那些条件,也是本领域技术人员所熟知的。

#### (9) 抗体的纯化

如果使用重组技术,抗体可在细胞内产生,在周质空间产生,或直接分泌到培养基内,其中包括从微生物培养物中分泌。如果抗体在细胞内合成,那么作为第一步,要去除宿主细胞的颗粒碎片,例如,通过离心或超滤。Better 等, *Science* 240:1041-1043(1988); ICSU Short Reports(ICSU 短报道) 10:105 (1990); 以及 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:457-461(1993)描述了一种分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的方法。(也可参见, [Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992)]。)

从微生物或哺乳动物细胞制备的抗体组合物可通过,例如,羟基磷灰石色谱、阳离子或阴离子交换层析和亲和层析纯化,其中亲和层析是优选的纯化技术。蛋白 A 是否合适作为亲和配基依赖于抗体的免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。基于人  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$  或  $\gamma 4$  重链,可用蛋白 A 纯化抗体(Lindmark 等, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13(1983))。推荐使用蛋白 G 纯化所有小鼠同种型抗体和人  $\gamma 3$ (Guss 等, *EMBO J.* 5:1567-1575(1986))。连接亲和性配基最常用的基质是琼脂糖,但是其他基质也可以使用。机械稳定性的基质如定孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯比琼脂糖更易达到较快的流速和较短的处理时间。如果抗体包含 C<sub>H3</sub> 区,那么可以利用 Bakerbond ABX™树脂(新泽西州菲利普斯勃格的 J.T.B 公司(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.))进行纯化。根据所回收的抗体,用于蛋白纯化的其他技术如利用离子交换柱进行分级、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅层析、利用阳离子或阴离子交换树脂进行肝素 SEPHAROSE™层析(例如聚天冬氨酸柱)、色

谱聚焦、SDS-PAGE 以及硫酸铵沉淀也可以使用。

### 嵌合抗体

啮齿类抗体单独或以偶联物的形式重复给予人体内可在受者体内产生抗啮齿类抗体的免疫反应；就是所谓的 HAMA 反应(人抗小鼠抗体)。如果需要重复给药，HAMA 反应会限制药理效应。通过用亲水聚合物如聚乙二醇化学修饰抗体或者通过利用基因工程方法制备结构更类似人抗体的抗体如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体或人工程化<sup>TM</sup>抗体可降低抗体的免疫原性。由于这种基因工程抗体在人体内的免疫原性比亲本小鼠单克隆抗体低，因此它们用于治疗人时产生过敏反应的风险会大大降低。因此，这些抗体在用于治疗时是优选的，其中包括用于人体内。

嵌合单克隆抗体中小鼠单克隆抗体的可变 Ig 区被融合到人恒定 Ig 区上，利用本领域已知的方法可制备嵌合抗体(参见，Morrison, S. L.,等，(1984)“嵌合人抗体分子；小鼠抗原结合区与人恒定区”(Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; 以及 Boulianne, G. L.等，Nature 312, 643-646.(1984))。例如，可结合 CEA 的啮齿类抗体的可变区基因序列可用人骨髓瘤蛋白的可变区取代，从而生成重组嵌合抗体。这些方法的细节参见 EP 194276、EP 0120694、EP 0125023、EP 0171496、EP 0173494 和 WO 86/01533。虽然某些嵌合的单克隆抗体已被证明在人体内具有较低的免疫原性，但是小鼠可变 Ig 区依然能导致明显的人抗鼠反应。

### 人源化抗体

人源化抗体可通过各种方法制备，其中包括，例如：(1)将非人补体决定区(CDR)嫁接到人框架区和恒定区上(这个过程在本领域中被称为通过“CDR 嫁接”人源化)，或者(2)移植完整的非人可变区，但是通过替换表面残基从而用人样表面“遮蔽”非人可变区(这个过程在本领域中被称为“镶面”)。在本发明中，人源化抗体包括“人源化”抗体和“镶面”抗体。这些方法见于，例如 Jones 等，Nature 321:522 525(1986); Morrison 等，Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855(1984); Morrison 和 Oi, Adv. Immunol., 44:65 92(1988); Verhoeyer 等，Science 239:1534 1536(1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498(1991); Padlan,

Molec. Immunol. 31(3):169-217(1994)和 Kettleborough, C.A.等, Protein Eng. 4(7):773-83(1991)的描述, 本文已完整纳入参考。

例如, 啮齿类抗体 CDR 的基因序列可以被分离出来, 或者合成出来, 并用同源人抗体基因的相应序列区取代, 形成具有原始啮齿类抗体特异性的人抗体。这些方法见于 EP 023940、WO 90/07861 和 WO91/09967 的描述。

CDR 嫁接包括将小鼠重链和轻链可变 Ig 区 6 个 CDR 中的一个或多个导入到人可变 Ig 区的四个合适框架区内, 这也被称为 CDR 嫁接。这种技术 (Riechmann, L., 等, Nature 332, 323(1988)) 利用保守的框架区 (FR1-FR4) 作为支架支持主要与抗原接触的 CDR 环。但是, CDR 嫁接的缺点在于产生的人源化抗体的结合亲和力明显低于原来的小鼠抗体, 因为框架区氨基酸的主要功能在于抗原结合, 以及因为 CDR 环的氨基酸会影响两个可变 Ig 区的联系。为了保持人源化单克隆抗体的亲和力, 可以通过选择与原来小鼠抗体的框架区最相似的人框架区, 或者根据抗原结合位点的计算机模型的帮助通过位点特异性突变框架区或 CDR 内的单个氨基酸来改善 CDR 嫁接技术 (例如 Co, M. S., 等, (1994), J. Immunol. 152, 2968-2976)。

人源化抗体的一种方法包括将非人重链和轻链序列与人重链和轻链序列一起排列, 根据排列的结果选择并用人框架区替换非人框架区, 制作分子模型预测人源化抗体的构型并与亲本抗体的构型进行比较。然后重复回复突变 CDR 区内的残基以打破 CDR 的结构, 直到人源化序列模型的预测构型非常接近亲本非人抗体的非人 CDR 的构型为止。这种人源化抗体还可以进一步衍化以促进摄取和清除, 例如, 通过 Ashwell 受体 (参见, 例如, 美国申请号 5,530,101 和 5,585,089, 本文已纳入作为参考)。

通过合理设计已经完成了多种小鼠单克隆抗体的人源化 (参见, 例如, 2002 年 7 月 11 日公开的 20020091240、WO 92/11018 和美国专利 No., 5,693,762、No. 5,766,866)。

### 人工程化™抗体

术语“人工程化™抗体”是指来源于非人抗体, 一般是小鼠单克隆抗体的抗体。另外, 人工程化™抗体可以来源于嵌合抗体, 这种嵌合抗体保留或基本保留了亲本非人抗体的抗原结合特性, 但是与亲本抗体相比在用于人体内时

无免疫原性。

Studnicka 已描述过抗体可变区的人工程化<sup>TM</sup>[参见, 例如, Studnicka 等, 美国专利号 5,766,886; Studnicka 等, Protein Engineering 7:805-814(1994)], 这种方法可用于降低免疫原性, 同时又能保持抗体分子的结合活性。根据该方法, 每一个可变区氨基酸都被设定了取代的风险。根据风险不同氨基酸取代可分为三组: (1)低风险改变是破坏抗原结合活性的可能最小, 并且最适合用于降低免疫原性的那些氨基酸; (2)中等风险改变是虽然可被用于进一步降低免疫原性, 但是有较大可能影响抗原结合或蛋白折叠的那些氨基酸; (3)高风险残基是对于结合或维持抗体结构具有重要作用并且最可能影响抗原结合或蛋白折叠的那些残基。由于脯氨酸在维持三维结构中的作用, 通常认为在脯氨酸上进行修饰至少是中等风险改变, 即使该位置一般是低风险位置。

在预先确定不可能对抗原结合或蛋白折叠产生不良影响但是可能会降低抗体在人体环境中的免疫原性的位置上替换人氨基酸, 这样啮齿类抗体的轻链和重链可变区就是人工程化<sup>TM</sup>的。通过使啮齿类可变区的氨基酸序列与人可变区序列一起排列可以鉴定出处于“低风险”位置并且能够用本发明的方法进行修饰的氨基酸残基。所有人可变区都可以应用, 其中包括独特的 VH 或 VL 序列、或者人共有 VH 或 VL 序列、或者独特的或共有的人种系序列。低风险位置上任意数目的氨基酸, 或者全部氨基酸残基都可以被改变。例如, 在每一个低风险位置上如果排列在一起的小鼠氨基酸残基和人氨基酸残基是不同的, 那么就可以用人的残基取代啮齿类的残基。另外, 所有低风险位置上的氨基酸残基以及任意数目的中等风险位置上的氨基酸残基都可以被改变。理想的状况是, 所有低风险和中等风险位置都从啮齿类序列改变为人序列以达到最低程度的免疫原性。

构建包含修饰重链和/或轻链可变区的合成基因并连接到人  $\gamma$  重链和/或  $\kappa$  轻链恒定区。所有人重链和轻链恒定区都可用于连接人工程化<sup>TM</sup>抗体可变区, 其中包括 IgA(所有亚类的 IgA, 如 gA1 或 IgA2)、IgD、IgE、IgG(所有亚类的 IgG, 如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)或 IgM。人重链和轻链可变区基因导入到宿主细胞如哺乳动物细胞内, 收获产生出的重组免疫球蛋白产物并鉴定其特征。

### 来自于转基因动物的人抗体

利用转基因动物可以生产抗靶抗原的人抗体,其中转基因动物不产生内源性免疫球蛋白,并且经过基因工程改造包含人免疫球蛋白基因座。例如,WO 98/24893 公开了包含人 Ig 基因座的转基因动物,其中动物因为其内源性的重链和轻链基因座被灭活因而不产生功能性的内源性免疫球蛋白。WO 91/10741 也公开了能够产生抗免疫原的免疫应答的非灵长类转基因哺乳动物宿主,其中抗体包含灵长类的恒定区和/或可变区,编码内源性免疫球蛋白的基因座被替换或被灭活。WO 96/30498 公开了 Cre/Lox 系统在修饰哺乳动物免疫球蛋白基因座中的用途,例如替换全部或部分恒定区或可变区从而形成经修饰的抗体分子。WO 94/02602 公开了包含灭活的内源性 Ig 基因座和功能性人 Ig 基因座的非人哺乳动物宿主。美国专利号 5,939,598 公开了制备转基因小鼠的方法,其中小鼠缺乏内源性重链,表达包含一个或多个异种恒定区的外源性免疫球蛋白基因座。

利用上述转基因动物可以诱导对所选抗原性分子的免疫应答,从动物体内收获抗体产生细胞,用于制备分泌人单克隆抗体的杂交瘤。免疫方法、佐剂等是本领域熟知的,可用于,例如,转基因小鼠的免疫,如 WO 96/33735 所述。这篇文献公开了抗各种抗原性分子如 IL 6、IL 8、TNF $\alpha$ 、人 CD4、L 选择素、gp39 和破伤风毒素的单克隆抗体。检测单克隆抗体抑制或中和相应蛋白的生物学活性或生理效应的能力。WO 96/33735 报道,来源于 IL-8 免疫转基因小鼠免疫细胞的抗 IL-8 单克隆抗体可阻断 IL-8 诱导的中性粒细胞的功能。用于免疫转基因动物的抗原的特异性人单克隆抗体还可见于 WO 96/34096 和美国专利申请号 20030194404; 以及美国专利申请号 20030031667 的描述。还可参见 Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits 等, Nature, 362:255-258(1993); Bruggermann 等, Year in Immuno., 7:33(1993); 以及美国专利号 5,591,669、美国专利号 5,589,369、美国专利号 5,545,807; 和美国专利申请号 20020199213、WO 96/34096 以及美国专利申请号 20030194404; 和美国专利申请号 20030031667。

可用于制备单克隆抗体的其他转基因动物包括美国专利号 5,770,429 和 Fishwild 等 (Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996) 所描述的 Medarex

HuMAb-MOUSE®，该动物包含来源于未重排人抗体基因的基因序列，其中的人抗体基因编码人抗体的重链和轻链。免疫 HuMAb-MOUSE®可产生抗靶蛋白的单克隆抗体。

另外，Ishida 等(Cloning Stem Cells. 4:91-102, 2002)描述了 TransChromo Mouse(转染色体小鼠) (TCMOUSE™)，这种动物包含兆碱基大小的人 DNA 区段，其中掺入完整的人免疫球蛋白(hIg)基因座。TCMOUSE 包含 hIg 的全部多样性库，其中包括 IgG 的所有亚类(IgG1-G4)。用各种人抗原免疫 TC Mouse 可产生包含人抗体的抗体应答。

美国专利申请号 20030092125 描述了使动物的免疫应答偏向于目的表位的方法。人抗体也可以通过在体外活化 B 细胞来制备(参见美国申请号 5,567,610 和 5,229,275)。

### 来自于噬菌体展示技术的抗体

制备重组人抗体基因库以及在丝状噬菌体表面展示编码抗体片段的技术的发展为我们提供了一种直接制备和筛选人抗体的重组方式，这种技术还可用于人源化、嵌合、鼠或突变蛋白的抗体。通过噬菌体技术制备的抗体是作为细菌内的抗原结合片段，通常是 Fv 或 Fab 片段而产生的，因此缺少效应功能。效应功能可通过两种策略之一引入：片段被改造成可在哺乳动物细胞内表达的完整抗体，或者被改造成包含能激发效应功能的第二结合位点的双特异性抗体片段。

一般而言，抗体的 Fd 片段( $V_H-C_H1$ )和轻链( $V_L-C_L$ )分别通过 PCR 克隆，然后随机重组到组合噬菌体展示文库中，然后根据与特定抗原的结合来筛选文库。Fab 片段表达在噬菌体表面，即，与编码它们的基因物理相连。因此，通过抗原结合来筛选 Fab 的同时也筛选了编码 Fab 的序列，后者可随后进行扩增。经过几轮的抗原结合和重复扩增就可以富集并最终分离出抗原特异性的 Fab，这一过程被称为淘选。

在 1994 年，报道了一种被称为“引导筛选”的抗体人源化方法。引导筛选利用噬菌体展示技术人源化小鼠单克隆抗体(参见 Jaspers, L.S., 等, Bio/Technology 12, 899-903(1994))。为了达到此目的，小鼠单克隆抗体的 Fd 片段与人轻链文库一起展示，得到的杂合 Fab 文库用抗原进行筛选。因而小鼠的

Fab 片段为引导筛选提供了一个模板。随后，筛选出的人轻链与人 Fd 片段文库结合。筛选所得到的文库就可以获得完整的人 Fab。

从噬菌体文库制备人抗体的各种方法都有报道(参见, 例如, Hoogenboom 等, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991); 美国申请号 5,565,332 和 5,573,905; Clackson, T.和 Wells, J. A., *TIBTECH* 12, 173-184(1994))。更具体地说, 利用噬菌体文库体外筛选和演化抗体已经成为一种有效的工具(参见 Burton, D. R.和 Barbas III, C. F., *Adv. Immunol.* 57, 191-280(1994)以及 Winter, G.,等, *Annu. Rev. Immunol.* 12, 433-455(1994); 美国专利申请号 20020004215 和 WO92/01047; 2003 年 10 月 9 日公开的美国专利申请号 20030190317 以及美国专利号 6,054,287; 美国专利号 5,877,293)。

Watkins, “通过捕获提升筛选噬菌体表达的抗体文库”(“Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift), 《分子生物学方法, 抗体噬菌体展示: 方法和操作手册》(*Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols*)178:187-193 以及 2003 年 3 月 6 日公开的美国专利申请号 200120030044772 描述了通过捕获提升(capture lift)筛选噬菌体表达抗体文库或其他结合分子的方法, 该方法包括将候选结合分子固定在固相支持物上。

也可以利用本文“筛选方法”部分所描述的方法以及本领域熟知的任何合适方法筛选抗体产物在本发明治疗方法中的活性和适用性。

### **氨基酸序列突变蛋白**

本发明的抗体包括亲本抗体的突变蛋白, 其中亲本抗体的多肽序列被改变, 具体是可变区或与可变区等价区域中, 包括 CDR 内至少有一个氨基酸取代、缺失或插入, 但是突变蛋白依然保留了所需的结合亲和力或生物学活性。突变体可以与亲本抗体基本同源或基本相同, 例如, 至少 65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的氨基酸相同或同源。有关这个序列的相同性或同源性在本文中被定义为, 当序列排列在一起, 如果需要可引入缺口, 达到最大序列相同性百分数后, 保守取代不被当作是序列相同性的一部分, 候选序列上与亲本序列相同的氨基酸参见所占的百分率。抗体

序列的 N 端、C 端或内部延伸、内部缺失或插入都被认为不会影响序列的相同性或同源性。因此，序列相同性可通过比较两个多肽的氨基酸位置的相似性常用的标准方法确定。利用计算机程序如 BLAST 或 FASTA，将两个多肽排列在一起使其各自的氨基酸达到最佳匹配(在一个或两个序列的全长上，或者在一个或两个序列的预先确定区域)。这种程序提供了默认的开放罚分和默认的缺口罚分，评分矩阵如 PAM250[标准评分矩阵；Dayhoff 等，《蛋白序列和结构图集》(*Atlas of Protein Sequence and Structure*)，第 5 卷，增刊 3(1978)]可配合计算机程序一起使用。例如，相同性百分数可按如下公式计算：匹配相同的总数/(匹配区间内较长序列的长度+为了比对两个序列而在较长序列内引入的缺口数)×100。

本发明的抗体还包括恒定区多肽序列的改变，这种改变不会影响结合亲和力但是会改变效应功能，如抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)、补体依赖的细胞毒作用(CDC)或清除和摄取(以及对半衰期的影响)。

#### 插入

氨基酸序列插入包括氨基端和/或羧基端融合，长度范围从一个残基到包含 100 或 100 以上残基的多肽，以及单个或多个氨基酸残基如 2、3 或更多氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括带 N 端甲硫氨酰残基的抗体，或与表位标签或补救受体表位融合的抗体。抗体分子的其它插入突变体包括添加糖基化位点、添加形成分子内或分子间键的半胱氨酸、或提高抗体血清半衰期的多肽融合，如融合到 N 端或 C 端。例如，半胱氨酸键可添加到抗体上以提高其稳定性(特别是当抗体是抗体片段如 Fv 片段时)。

抗体的糖基化通常是 N-连接的或 O-连接的。N-连接是指糖基基序连接到天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是糖基基序经酶催化连接到天冬酰胺侧链上的识别序列，其中 X 是除脯氨酸之外的任何氨基酸。多肽上的这些三肽序列只要有一个存在就可以成为潜在的糖基化位点。因此，N-连接糖基化位点可以通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个这种三肽序列添加到抗体上。O-连接糖基化是指一个糖基 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖连接到羟氨基酸上，最常见的是丝氨



酸或苏氨酸，尽管 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸也可以使用。O-连接糖基化位点可通过将一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基插入到原始抗体的序列上或者用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代原始抗体的序列来添加到抗体上。

术语“标记的表位”是指融合到表位标签上的抗体。表位标签多肽有足够多的残基以提供表位从而可制造针对该表位的抗体，但是表位标签又很短，因此不会影响抗体的活性。优选的表位标签是十分独特的，这样抗该表位的抗体基本不与其他表位有交叉反应。适宜的表位标签多肽一般包含至少 6 个氨基酸残基，通常在约 8-50 个氨基酸残基之间(优选约 9-30 个残基)。表位标签的例子包括流感病毒血凝素标签多肽及其抗体 12CA5 [Field 等, *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165(1988)]; c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体 [Evan 等, *Mol. Cell. Biol.* 5(12):3610-3616(1985)]; 以及单纯疱疹病毒糖蛋白 D(gD)标签及其抗体[Paborsky 等, *Protein Engineering* 3(6):547-553(1990)]。其他典型的标签是多聚组氨酸序列，一般约 6 个组氨酸残基，利用镍螯合技术可以分离标记有这种标签的化合物。其他标记和标签如 FLAG®标签(纽约罗彻斯特柯达公司(Eastman Kodak, Rochester, NY))是本领域熟知和常用的，也包括在本发明的范围内。

在本文中，术语“补救受体结合表位”是指 IgG 分子(如 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub> 或 IgG<sub>4</sub>)的 Fc 区上负责提高 IgG 分子在体内的血清半衰期的表位。

#### 缺失

氨基酸序列缺失包括长度从 1 个到 100 或 100 个以上残基的氨基端和/或羧基端缺失，但是得到的片段还保留对靶抗原的结合亲和力，以及单个或多个氨基酸残基如 2、3 或更多氨基酸残基的序列内缺失。例如，通过缺失糖基化的部分或全部三肽序列或其他识别序列来删除糖基化位点或者将糖基化位点转移到其他位置。

#### 取代

另一类突变体是氨基酸取代突变。在这些突变体中，抗体分子的至少一个氨基酸残基被去除，同时在其位置上插入了另一个不同的残基。本发明包括超变区或 CDR 区或框架区内的取代突变。保守取代列于下面的表 2 中。如果这种取代不导致生物活性的改变，则可以引入表 2 中被称为“示范

性取代”的更多实质改变或者在下文氨基酸分类部分所进一步描述的更多实质改变，并且用于产物筛选。

表 2

起始残基	示范性取代	优选的残基取代
Ala(A)	val; leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys
Asn(N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
Asp(D)	glu; asn	glu
Cys(C)	ser; ala	ser
Gln(Q)	asn; glu	asn
Glu(E)	asp; gln	asp
Gly(G)	ala	
His(H)	asn; gln; lys; arg	
Ile(I)	leu; val; met; ala;	leu
	phe;	正亮氨酸
Leu(L)	norleucine; ile; val;	ile
	met; ala; phe	
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro(P)	ala	
Ser(S)	thr	
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe;	leu
	ala; 正亮氨酸	

抗体生物学特性的实质改变可通过筛选取代来完成，其中取代在以下方面具有明显不同的效应：(a)维持取代区多肽骨架的结构，例如，形成折叠或螺旋构型，(b)维持分子在靶位上的电荷或疏水性，或(c)维持侧链的松散性(bulk)。天然残基根据常见的侧链特性可分成以下几组：

- (1) 疏水性的：正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile；
- (2) 中性亲水性的：cys、ser、thr；
- (3) 酸性的：asp、glu；
- (4) 碱性的：asn、gln、his、lys、arg；

(5) 影响侧链方向的残基: gly、pro; 以及

(6) 芳香族残基: trp、tyr、phe。

保守取代包括用同一类氨基酸中的其他成员取代该氨基酸。非保守取代包括用另一类氨基酸的成员取代这些类中一类的成员。

不参与维持抗体正确构型的所有半胱氨酸残基都可以被取代, 一般是用丝氨酸取代, 以改善分子的氧化稳定性, 阻止异常交联发生。

亲和力成熟通常包括制备和筛选亲本抗体 CDR 内有取代的抗体突变蛋白以及筛选生物学特性如结合亲和力比亲本抗体高的突变蛋白。制备这种取代突变蛋白的一种简便方法是利用噬菌体展示技术进行亲和力成熟。简言之, 突变几个超变区位点(例如, 6-7 个位点)以使每个位点上都包含所有可能的氨基酸取代。然后将制备出的抗体突变蛋白与包裹在每个丝状噬菌体颗粒内的 M13 的基因 III 产物融合并以单价方式展示在噬菌体颗粒上。然后再根据生物学活性(例如, 结合亲和力)筛选噬菌体展示的突变蛋白。参见, 例如, WO 92/01047、WO 93/112366、WO 95/15388 和 WO 93/19172。

目前所用的抗体亲和力成熟方法属于两类突变技术: 随机的和非随机的。易错 PCR、诱变菌株(Low 等, *J. Mol. Biol.* 260, 359-68, 1996)和饱和突变(Nishimiya 等, *J. Biol. Chem.* 275:12813-20, 2000; Chowdhury, P. S., *Methods Mol. Biol.* 178, 269-85, 2002)属于典型的随机突变方法(Rajpal 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8466-71, 2005)。非随机突变技术通常利用丙氨酸扫描或位点特异性诱变制备有限的特异性突变蛋白集合。某些方法将在下文作进一步描述。

**通过淘选方法进行亲和力成熟**—重组抗体的亲和力成熟通常通过几轮淘选候选抗体来完成, 随着淘选轮次的增加抗原数量逐渐减少。每一轮抗原数量的减少都会筛选出具有最高抗原亲和力的抗体, 从而可以从一大群起始材料中得到具有高亲和力的抗体。通过淘选进行亲和力成熟是本领域所述的, 可见于, 例如, Huls 等, (*Cancer Immunol Immunother.* 50:163-71, 2001)的描述。利用噬菌体展示技术进行亲和力成熟的方法在本文的其他地方也有描述, 也是本领域所熟知的(参见, 例如, Daugherty 等, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:2029-34, 2000)。

**精确突变(Look-through mutagenesis)**—精确突变(LTM)(Rajpal 等, *Proc*

*Natl Acad Sci U S A.* 102:8466-71, 2005)提供了一种快速绘制抗体结合位点地图的方法。在 LTM 中,代表 20 种天然氨基酸所提供的主要侧链化学的 9 种氨基酸被用于分析在抗体所有 6 个 CDR 的每一个位置上功能侧链对结合的贡献大小。LTM 可在 CDR 内产生一系列单突变,其中每一个“野生型”残基都被所选出的 9 个氨基酸中的一个有组织的取代。突变的 CDR 组合在一起就形成了复杂性和容量不断增加但不会妨碍所用突变蛋白定量展示的组合单链可变区片段(scFv)文库。经过正筛选以后,结合活性升高的克隆测序,绘制出有益的突变。

**易错 PCR**—易错 PCR 包括不同筛选轮次之间的核酸的随机化。由聚合酶内源性出错频率导致的随机化发生率很低,但是在转录期间使用具有高内源性出错率的聚合物(Hawkins 等, *J Mol Biol.* 226:889-96, 1992)进行易错 PCR 可提高随机化发生率(Zaccolo 等, *J. Mol. Biol.* 285:775-783, 1999)。经过多个突变循环以后,利用本领域的常规方法可以筛选出抗原亲和力升高的克隆。

**DNA 改组**—核酸改组是一种在体内或体外同源重组一群较短的或较小的多聚核苷酸以制备突变多聚核苷酸的方法。DNA 改组可见于美国专利号 6,605,449、美国专利 6,489,145、WO 02/092780 和 Stemmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:10747-51(1994)的描述。一般而言, DNA 改组包括三步:用 DNA 酶 I 将需要改组的基因片段化,片段随机杂交并在 DNA 聚合酶存在的条件下通过 PCR(有性 PCR)装配或填充片段化的基因,以及通过常规 PCR 扩增重新装配的产物。

DNA 改组与易错 PCR 不同,后者是反向链式反应。在易错 PCR 中,聚合酶起始位点数目和分子数量呈指数升高。与之相反,在核酸重装配或随机多聚核苷酸改组中,起始位点的数目和随机多聚核苷酸的数目(而不是大小)随时间延长而减少。

对于抗体来说, DNA 改组可以使所有的 CDR1、所有的 CDR2 和所有的 CDR3 自由组合连接。值得注意的是,在同一个反应中,多个家族的序列可以同时被改组。另外,改组通常具有相当次序,因此,例如, CDR1 一般不会出现现在 CDR2 的位置。稀有的改组子包含大量的上佳(例如,最高亲和力的)CDR,这些稀有改组子可根据其超级亲和力进行筛选。

可用于 DNA 改组的多聚核苷酸模板可以是 DNA 或 RNA。根据被重组或重装配的基因或者较短或较小多聚核苷酸的大小，模板可以是各种长度的。优选的是，多聚核苷酸的长度为 50bp 到 50kb。多聚核苷酸模板一般是双链。

值得注意的是，在基因筛选的起始步骤，包含与多聚核苷酸模板具有相同性的区以及多聚核苷酸模板具有异质性的区的单链或双链核酸可被添加到多聚核苷酸模板上。还应当注意的是，在起始步骤中，两个不同但相关的多聚核苷酸模板可以混合在一起。

**丙氨酸扫描** – 丙氨酸扫描诱变可用于鉴定对抗原结合有明显影响的超变区残基。Cunningham 和 Wells(Science, 244:1081-1085(1989))。残基或靶残基的基团被鉴定(例如，带电荷的残基如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸)并被中性的或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)取代以影响氨基酸与抗原的相互作用。那些被证明对取代具有功能敏感性的氨基酸位置再通过取代位点上进一步引入突变或引入其他突变来确认。因此，虽然引入氨基酸序列改变的位点要被预先确定，但是突变的本质性质无须预先确定。例如，为了分析给定位点上突变的表现，要在靶编码区或编码区上进行丙氨酸扫描或随机诱变，然后筛选表达的具有理想活性的抗体突变体。

**计算机辅助设计** – 另外，分析抗原-抗体复合物的晶体结构是有用的，晶体结构可用于鉴定抗体和抗原之间的接触点，或者用于通过计算机软件制作这种接触点的模型。这种接触残基及其邻近残基是利用本文所述的技术进行取代的候选残基。一旦制备出这样的突变蛋白，就可以按照本文所述的方法筛选这一组突变蛋白，筛选出在一个或多个相关分析中具有优越特性的抗体用于进一步的开发。

**亲和力成熟**通常包括制备和筛选亲本抗体 CDR 内有取代的抗体突变体以及筛选生物学特性如结合亲和力比亲本抗体高的突变体。制备这种取代突变体的一种简便方法是利用噬菌体展示技术进行亲和力成熟。简言之，突变几个超变区位点(例如，6-7 个位点)以使每个位点上包含所有可能的氨基酸取代。然后将制备出的抗体突变体与包裹在每个丝状噬菌体颗粒内的 M13 的基因 III 产物融合并以单价方式展示在噬菌体颗粒上。然后再根据生物学活性(例如，结合亲和力)筛选噬菌体展示的突变体。

丙氨酸扫描诱变可用于鉴定对抗原结合有明显影响的超变区残基。另外，分析抗原-抗体复合物的晶体结构是有用的，晶体结构可用于鉴定抗体和抗原之间的接触点。这种接触残基及其邻近残基是利用本文所述的技术进行取代的候选残基。一旦制备出这样的突变体，就可以按照本文所述的方法筛选这一组突变体，筛选出在一个和多个相关分析中具有优越特性的抗体用于进一步的开发。

### 改变的效应功能

本发明还涉及抗体的其他修饰。可能需要修饰本发明抗体的效应功能，例如，增强抗体的癌症疗效。例如，半胱氨酸残基可以被引入到 Fc 区，从而允许在该区形成链间二硫键。因此，由此制备出的同源二聚体抗体的内化能力得以提高，和/或补体介导的细胞杀伤和抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)得以增强。参见 Caron 等，J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)和 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922(1992)。活性增强的同源二聚体抗体还可以用异源双功能交联接头来制备，如 Wolff 等，Cancer Research 53:2560-2565 (1993)的描述。另外，抗体可以经过改造使其包含两个 Fc 区，从而增强其补体裂解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等，Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。另外，试验证明 CDR 内的序列可使抗体与 MHC II 类分子结合，激发不必要的辅助 T 细胞反应。保守取代可使抗体保留其结合活性，但是却丧失了激发不必要 T 细胞反应的能力。也可参见 Steplewski 等，Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6，本文已完整纳入作为参考，在该文献所描述的嵌合抗体中，小鼠的可变区与人的  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$  和  $\gamma 4$  恒定区相连。

在本发明的某些实施方式中，比较理想的是用抗体片段而不是完整抗体来增加肿瘤渗透性。在这种情况下，最好修饰抗体片段以提高其血清半衰期，例如，在抗体片段上添加分子如 PEG 或其他水溶性聚合物，其中包括多糖聚合物，以提高半衰期。也可以通过，例如，在抗体片段上插入补救受体结合表位来达到此目的(例如，通过突变抗体片段上的合适区域或者将表位插入到肽标签内然后融合到抗体片段的一端或者插入到抗体片段中间，例如，通过 DNA 或肽合成)(参见，例如，WO96/32478)。

补救受体结合表位优选组成一个区，其中来自 Fc 区的一个或两个环的一

个或多个氨基酸残基被转移到抗体片段的相似位置。更优选的是，转移 Fc 区的一个或两个环的 3 个或 3 个以上残基。更优选的是，表位来自于 Fc 区(如 IgG 的 Fc 区)的 CH2 区并被转移到 CH1、CH3 或 VH 区或者抗体的多个这样的区内。另外，表位来自于 Fc 区的 CH2 区并被转移到抗体片段的 C<sub>L</sub> 区或 V<sub>L</sub> 区，或者这两个区内。也可参见国际申请 WO 97/34631 和 WO 96/32478，其中描述了 Fc 突变体及其与补救受体的相互作用。

因此，本发明的抗体可包含人 Fc 部分、人共有 Fc 部分或其突变体，其中突变体保留了与 Fc 补救受体相互作用的能力，这些突变体中参与形成二硫键的半胱氨酸被修饰或被去除，和/或甲硫氨酸被添加在 N 端，和/或 N 端 20 个氨基酸中的一个或多个被删除，和/或与补体结合的区域如 C1q 结合位点被删除，和/或 ADCC 位点被删除[参见，例如，Molec. Immunol. 29(5):633-9(1992)]。IgG 类的抗体也可以包含不同的恒定区，例如，IgG2 抗体经修饰后具有了 IgG1 或 IgG4 的恒定区。

对于 IgG1 来说，对恒定区特别是铰链区或 CH2 区的修饰可增强或降低效应功能，其中包括 ADCC 和/或 CDC 活性。在其他实施方式中，IgG2 恒定区经修饰后可降低抗体-抗原凝集物的形成。对于 IgG4 来说，对恒定区特别是铰链区的修饰可减少半抗体的形成。在特别典型的实施方式中，本发明涉及将 IgG4 铰链区序列 Cys-Pro-Ser-Cys 突变成 IgG1 铰链区序列 Cys-Pro-Pro-Cys。

以前的研究已经绘制出了人和小鼠 IgG 上的 FcR 结合位点的地图，这些位点主要位于低铰链区，由 IgG 残基 233-239 组成。其他研究结果表明，另外一些片段，例如，Gly316-Lys338 用于结合人 Fc 受体 I，Lys274-Arg301 和 Tyr407-Arg416 用于结合人 Fc 受体 III，或者在低铰链区之外有几个特殊的残基，例如小鼠 IgG2b 的 Asn297 和 Glu318 与小鼠 Fc 受体 II 相互作用。文献报道的人 IgG1 Fc 片段与人 Fc 受体 IIIA 结合的 3.2-Å 晶体结构说明 IgG1 残基 Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299 和 Ala327-Ile332 参与和 Fc 受体 IIIA 的结合。该研究根据晶体结构证明，除了低铰链区(Leu234-Gly237)、IgG CH2 区环 FG(残基 326-330)和 BC(残基 265-271)可能在与 Fc 受体 IIA 结合时发挥关键作用。参见 Shields 等，*J. Biol. Chem.*，276(9):6591-6604(2001)，本文已完整纳入作为参考。Fc 受体结合位点内的残基突变可导致效应功能的改变，例

如 ADCC 或 CDC 活性的改变, 或者半衰期的改变。如上所述, 有效突变包括一个和多个残基的插入、缺失或取代, 其中包括丙氨酸的取代、保守取代、非保守取代或用不同 IgG 亚类同一位置上的相应氨基酸残基的取代(例如, 用 IgG2 该位置的相应残基取代 IgG1 的残基)。

Shields 等报道, 参与结合所有人 Fc 受体的 IgG1 残基定位于靠近铰链区的 CH2 区, 可分为如下两类: 1)与所有 FcR 直接相互作用的位置, 其中包括 Leu234-Pro238、Ala327 和 Pro329(可能还有 Asp265; 2)影响糖链性质的位置或者包含 Asp265 和 Asn297 的位置。影响与 Fc 受体 II 结合的其他 IgG1 残基还有(影响最大的)Arg255、Thr256、Glu258、Ser267、Asp270、Glu272、Asp280、Arg292、Ser298, 以及(影响较小的)His268、Asn276、His285、Asn286、Lys290、Gln295、Arg301、Thr307、Leu309、Asn315、Lys322、Lys326、Pro331、Ser337、Ala339、Ala378 和 Lys414。A327Q、A327S、P329A、D265A 和 D270A 抑制结合。除了已鉴定出的影响结合所有 FcR 的上述结合以外, 可使 Fc 受体 IIIA 结合下降 40%或更多的其他 IgG1 残基有: Ser239、Ser267(只有 Gly)、His268、Glu293、Gln295、Tyr296、Arg301、Val303、Lys338 和 Asp376。与 FcRIIIA 的结合活性提高的突变包括 T256A、K290A、S298A、E333A、K334A 和 A339T。试验证明, Lys414 突变可使与 FcRIIA 和 FcRIIB 的结合活性下降 40%, Arg416 突变可使与 FcRIIA 和 FcRIIIA 的结合活性下降 30%, Gln419 突变可使与 FcRIIA 的结合活性下降 30%, 与 FcRIIB 的结合活性下降 40%, 以及 Lys360 突变可使与 FcRIIIA 的结合活性升高 23%。也可参见 Presta 等, *Biochem. Soc. Trans.*(2001) 30, 487-490。

例如, 美国专利号 6,194,551, 本文已完整纳入作为参考, 描述了效应功能发生改变的突变体, 该突变体的人 IgG Fc 区的 329、331 或 322 位(根据 Kabat 编号)氨基酸发生了突变, 其中某些突变显示可降低 C1q 结合活性或 CDC 活性。作为另一个例子, 美国专利号 6,737,056, 本文已完整纳入作为参考, 描述了效应功能或 Fc $\gamma$  受体结合活性发生改变的突变体, 其中的突变发生在人 IgG Fc 区的 238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、



330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 或 439 位氨基酸(根据 Kabat 编号), 某些突变体显示出了与 ADCC 或 CDC 活性下降相关的受体结合特征。在这些突变中, 238、265、269、270、327 或 329 位氨基酸的突变可降低突变体与 FCRI 的结合活性, 238、265、269、270、292、294、295、298、303、324、327、329、333、335、338、373、376、414、416、419、435、438 或 439 位氨基酸的突变可降低突变体与 FCRII 的结合活性, 以及 238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、293、294、295、296、301、303、322、327、329、338、340、373、376、382、388、389、416、434、435 或 437 位氨基酸的突变可降低突变体与 FCRIII 的结合活性。

美国专利号 5,624,821 报道, 本文已完整纳入作为参考, 小鼠抗体的 CIq 结合活性可通过突变重链的氨基酸残基 318、320 或 322 来改变, 取代残基 297(Asn)可导致溶解活性消失。

美国专利申请出版号 20040132101, 本文已纳入作为参考, 描述了在 240、244、245、247、262、263、266、299、313、325、328 或 332 位(根据 Kabat 编号), 或者 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 或 332 位(根据 Kabat 编号)包含突变的突变体, 234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330 或 332 位的突变可降低抗体的 ADCC 活性或降低抗体与 Fc $\gamma$  受体结合的能力。

Chappel 等, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(20):9036-40 报道, 本文已完整纳入作为参考, IgG1 的嗜细胞活性是其重链 CH2 区的内在特性。IgG1 的 234-237 位氨基酸中任一氨基酸的单点突变都可以明显降低甚至消除其活性。将 IgG1 残基 234-237(LLGG)都取代成 IgG2 和 IgG4 是恢复完整结合活性所必须的。实验证明包含完整 ELLGGP 序列(残基 233-238)的 IgG2 抗体比野生型 IgG1 的活性更高。

Isaacs 等, J Immunol. 1998;161(8):3862-9 报道, Fc $\gamma$ R 结合关键基序内的突变(谷氨酰胺 233 突变成脯氨酸, 亮氨酸/苯丙氨酸 234 突变成缬氨酸, 亮氨

酸 235 突变成丙氨酸)可完全阻断靶细胞的杀伤。谷氨酰胺 318 突变成丙氨酸可消除小鼠 IgG2b 的效应功能,也能降低人 IgG4 的活性。

Armour 等, Mol Immunol. 2003;40(9):585-93, 本文已完整纳入作为参考, 鉴定了 IgG1 突变体, 该突变体与活化受体 FcγRIIa 反应的活性比野生型 IgG1 至少低 10 倍, 但是与抑制性受体 FcγRIIb 结合的能力只下降 4 倍。突变还发生在氨基酸 233-236 区和/或 327、330 和 331 位氨基酸上。也可参见 WO 99/58572, 本文已完整纳入作为参考。

Xu 等, J Biol Chem. 1994; 269(5):3469-74 报道, 本文已完整纳入作为参考, 将 IgG1 Pro331 突变成丝氨酸可显著降低 C1q 结合活性, 并且能基本消除抗体的溶解活性。相反, 用 Pro 取代 IgG4 的 Ser331 只能将部分溶解活性(40%)赋予 IgG4 Pro331 突变体。

Schuurman 等, Mol Immunol. 2001;38(1):1-8 报道, 本文已完整纳入作为参考, 将参与重链内键形成的一个铰链区半胱氨酸 Cys226 突变成丝氨酸可使重链内的连接更稳定。将 IgG4 铰链区序列 Cys-Pro-Ser-Cys 突变成 IgG1 铰链区序列 Cys-Pro-Pro-Cys 也能够明显稳定重链之间的共价连接。

Angal 等, Mol Immunol. 1993;30(1):105-8 报道, 本文已完整纳入作为参考, 与原始的嵌合 IgG4 相比, 将 IgG4 内 241 位的丝氨酸突变成脯氨酸(在 IgG1 和 IgG2 的相应位置上脯氨酸)可导致匀质抗体产生、血清半衰期延长以及组织分布得以改善。

本发明还涉及因糖链结构改变而导致效应活性发生改变的抗体分子的制备, 其中包括缺少岩藻糖基化或岩藻糖基化程度降低的抗体分子, 这种抗体分子的 ADCC 活性升高。本领域的多种方法都可以实现这一目的。例如, ADCC 效应活性是由抗体分子与 FcγRIII 受体的结合介导的, 研究发现其结合依赖于 CH2 区 Asn-297 位置上 N 连接糖基化的糖链结构。非岩藻糖基化的抗体与这个受体的结合亲和力提高, 与天然的岩藻糖基化抗体相比能更有效地激发 FcγRIII-介导的效应功能。例如, 利用重组方法在 α-1,6-岩藻糖基转移酶被敲除的 CHO 细胞内制备非岩藻糖基化的抗体可得到 ADCC 活性升高 100 倍的抗体 [Yamane-Ohnuki 等, Biotechnol Bioeng. 2004 Sep 5;87(5):614-22]。通过降低岩藻糖基化通路的这个酶或其他酶的活性也可以达到同样的效应, 例如, 通过

siRNA 或反义 RNA 处理、改造细胞系以敲除酶、或者用选择性糖基化抑制剂培养[Rothman 等, Mol Immunol. 1989 Dec;26(12):1113-23]。某些宿主细胞系如 Lec13 或大鼠杂交瘤细胞系 YB2/0 可天然地产生低岩藻糖基化水平的抗体。Shields 等, J Biol Chem. 2002 Jul 26;277(30):26733-40; Shinkawa 等, J Biol Chem. 2003 Jan 31;278(5):3466-73。试验证明, 提高双叉糖链的水平, 例如, 通过在过量表达 GnTIII 酶的细胞内重组制备抗体, 也能够提高抗体的 ADCC 活性。Umana 等, Nat Biotechnol. 1999 Feb;17(2):176-80。据预测, 两个岩藻糖残基中仅仅缺少一个就足以提高抗体的 ADCC 活性。Ferrara 等, J Biol Chem. 2005-12-5。

### 其他共价修饰

抗体的共价修饰也包括在本发明的范围之内。如果适用的话, 共价修饰可通过化学合成或通过抗体的酶促或化学切割实现。其他类型的抗体共价修饰可通过抗体的靶氨基酸残基与能和特定侧链或 N 端或 C 端残基发生反应的有机衍生试剂发生反应而导入到分子内。

最常见的是半胱氨酸残基与  $\alpha$ -卤素乙酸盐(及相应的胺)如氯乙酸或氯乙酰胺反应形成羧甲基或羧胺甲基衍生物。半胱氨酸残基也可以通过与溴代三氟乙酸、 $\alpha$ -溴- $\beta$ -(5-咪唑)丙酸、磷酸氯乙酰、3-氮-2-吡啶二硫化物、甲基-2-吡啶二硫化物、p-氯汞苯甲酸、2-氯汞基-4-硝基酚或氯-7-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑反应来生成。

组氨酰残基可通过与焦碳酸二乙酯在 pH5.5-7.0 的条件下反应来衍生, 因为这个试剂对组氨酰侧链有相对的特异性。对溴苯酰甲基溴也可以适用; 反应优选在 pH6.0 的 0.1 M 二甲胂酸钠中进行。

赖氨酰残基和氨基端残基可与琥珀酸酐或其他羧酸酐反应。利用这些试剂进行衍生可对赖氨酰残基的电荷产生反向效应。适于衍生含  $\alpha$  氨基残基的试剂包括亚氨酸酯类如吡啶甲酸亚胺甲酯(methyl picolinimidate)、磷酸吡哆醛、氢硼化氯(chloroborohydride)、三硝基苯磺酸、O-甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸的反应。

精氨酰残基可通过与一种或几种常规试剂反应来修饰, 其中包括苯甲酰甲醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茛三酮。精氨酸残基的衍生需要在碱性条件下

进行反应，因为胍官能团具有较高的  $pK_a$ 。另外，这些试剂可与赖氨酸的基团以及精氨酸  $\epsilon$ -氨基反应。

为了特定的目的可以对酪氨酸残基进行特殊修饰，例如，为了将光谱标签导入到酪氨酸残基内，可以和芳香族重氮化合物或四硝基甲烷反应。最常见的是 N-乙酰咪唑(N-acetylimidazole)和四硝基甲烷用于分别形成 O-乙酰酪氨酸残基和 3-硝基衍生物。酪氨酸残基用  $^{125}\text{I}$  或  $^{131}\text{I}$  碘化后形成标记蛋白，可用于放免分析。

羧基侧链基团(天冬氨酸或谷氨酸)可通过与碳二亚胺类( $\text{R-N}=\text{C}=\text{N-R}'$ )反应进行特异性的修饰，其中 R 和 R' 是不同的烷基，如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基苯基)碳二亚胺。另外，天冬氨酸和谷氨酸残基可通过与铵离子反应而转化成天冬酰胺和谷氨酸残基。

谷氨酸和天冬氨酸残基常常会脱去酰胺基分别形成相应的谷氨酸和天冬氨酸残基。这些残基在中性或碱性条件下脱去酰胺基。这些残基的脱酰胺基形式也包括在本发明的范围之内。

其他修饰包括脯氨酸和赖氨酸的羟化、丝氨酸和苏氨酸残基羟基的磷酸化、赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的  $\alpha$  氨基的甲基化(T. E. Creighton, 《蛋白质:结构和分子特性》(Proteins:Structure and Molecular Properties), 洛杉矶 WHF 公司(W.H. Freeman & Co., San Francisco), 79-86 页(1983))、N 端氨基的乙酰化以及任一 C 端羧基的酰胺化。

另一类共价修饰包括在抗体上化学或酶促偶联糖苷。这些方法的优点在于不需要在具有 N-或 O-糖基化能力的宿主细胞内制备抗体。根据所使用的偶联模式，糖可被连接到(a)精氨酸和组氨酸，(b)游离羧基，(c)游离巯基如半胱氨酸的那些巯基，(d)游离羟基如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些游离羟基，或者(f)谷氨酸的氨基上。这些方法可见于 1987 年 11 月 11 日公开的 WO87/05330 以及 Aplin 和 Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 59-306 页(1981) 的描述。

利用化学方法或酶促方法可以去除抗体上所有的糖链基序。化学去糖基化需要将抗体暴露于三氟甲磺酸或其等价化合物中。这种处理可将除连接糖基(N-乙酰葡萄糖胺或 N-乙酰半乳糖胺)之外的大部分或所有糖基裂解，但是依然

能保持抗体的完整性。化学去糖基化的方法可见于 Hakimuddin,等, Arch. Biochem. Biophys. 259:52(1987)和 Edge 等, Anal. Biochem., 118:131(1981)的描述。酶促切割抗体上的糖链基序可通过使用各种内源性和外源性糖苷酶来实现, 如 Thotakura 等, Meth. Enzymol. 138:350(1987)所述。

抗体的另一类共价修饰包括将抗体连接到各种非蛋白聚合物上, 例如, 聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧乙基多元醇、聚氧乙基山梨醇、聚氧乙基葡萄糖、聚氧乙基甘油、聚氧乙烯或多糖聚合物如葡聚糖。这种方法是本领域熟知的, 参见, 例如, 美国申请号 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; 4,179,337; 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285; 4,609,546 或 EP 315 456。

每一个抗体分子可以连接一个或多个(即, 1、2、3、4、5 或更多)聚合物分子。聚合物分子优选通过接头分子连接到抗体上。一般而言, 聚合物可以是合成的或天然的聚合物, 例如, 任选取代直链或支链聚烯烃、聚氧烷烯聚合物、支链或非支链多糖, 如同多糖和杂多糖。优选的聚合物是聚氧乙基多元醇和聚乙二醇(PEG)。PEG 在室温下是水溶性的, 通用化学式为  $R(O-CH_2-CH_2)_n O-R$ , 其中 R 是氢或保护性基团, 如烷基或链烯醇基。优选的是, 保护性基团含有 1 到 8 个碳原子, 更优选的是甲基。符号 n 是正整数, 优选 1 到 1000, 更优选 2 到 500。优选的 PEG 是平均分子量为 1000 到 40000 的 PEG, 更优选的是 2000 到 20000, 最优选的是 3000 到 12000。优选的是, PEG 至少包含一个羟基, 更优选的是包含末端羟基。这个羟基优选通过与抑制剂上的游离氨基反应而活化。但是, 应当理解的是, 活泼基团的类型和数量是可以变化的, 只要能使 PEG 和本发明的抗体共价连接就可以。优选的聚合物以及将其连接到肽上的方法可见于美国申请号 4,766,106; 4,179,337; 4,495,285 和 4,609,546, 本文都已完整纳入作为参考。

### 基因治疗

治疗性抗体向合适细胞的转移可以通过使用本领域熟知的任何合适方法进行体外、原位或体内基因治疗来加以改变, 其中包括通过使用 DNA 物理转移方法(例如, 脂质体或化学处理)、或者通过使用病毒载体(例如, 腺病毒、腺相关病毒或逆转录病毒)。例如, 当进行体内治疗时, 可将编码目的抗体的核酸单独或者与载体、脂质体或沉淀物一起注射到患者体内, 在某些实施方式中,

可以注射到需要抗体化合物在其中表达的部位。对于体外处理来说,取出患者的细胞,将核酸导入到这些细胞内,然后将修饰过的细胞直接或者用多孔膜包裹后回输到患者体内,其中包裹细胞的多孔膜可植入到患者体内。参见,例如,美国申请号 4,892,538 和 5,283,187。目前有许多技术可用于将核酸导入到活细胞内。选择何种方法要根据核酸是转移到体外培养的细胞内还是转移到目的宿主体内的细胞内而定。适于将核酸转移到体外的哺乳动物细胞内的技术包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖和钙磷酸盐沉淀。体外转移核酸的常用载体是逆转录病毒。

其他体内核酸转移技术包括用病毒载体(如腺病毒、单纯疱疹 I 病毒或腺相关病毒)和脂质系统转染。任选是,核酸和转染试剂与微粒相连。典型的转染试剂包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、季铵双亲性 DOTMA((二油酰氧基丙基)三甲基溴化铵(商品名为 Lipofectin, GIBCO-BRL)(Felgner 等, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone 等, (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86 6077-6081); 含下垂三甲铵头的亲脂性谷氨酸二酯(Ito 等, (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023, 124-132); 可代谢的亲本脂质如阳离子脂质二-十八烷基酰氨基甘氨酸精胺(dioctadecylamido glycylyspermine)(DOGS, Transfectam, 普洛麦格公司(Promega))和二-棕榈酰磷脂酰乙醇胺基精胺(dipalmitoylphosphatidyl ethanolamylspermine) (DPPE) (J. P. Behr(1986) Tetrahedron Lett. 27, 5861-5864; J. P. Behr 等, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986); 可代谢的季铵盐(DOTB, N-[1-(2,3-二油酰基氧)丙基]-N,N,N-三甲氨基甲基硫酸(DOTAP)(Boehringer Mannheim)、聚乙烯亚胺(PEI)、二油酰酯类、ChoTB、ChoSC、DOSC) (Leventis 等, (1990) Biochim. Inter. 22, 235-241); 3 $\beta$ [N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰]胆固醇(DC-Chol), 二油酰基磷脂酰乙醇胺(DOPE)/3 $\beta$ [N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)-氨甲酰]胆固醇 1:1 的混合物 (Gao 等, (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065, 8-14), 精胺、精脘、脂多胺(Behr 等, Bioconjugate Chem, 1994, 5:382-389), 亲脂性的聚赖氨酸(LPLL)(Zhou 等, (1991) Biochim. Biophys. Acta 939, 8-18), 带额外磷脂酰胆碱/胆固醇的 [[[1,1,3,3-四甲基丁基)甲苯氧基]乙氧基]乙基]二甲基苄基铵氢氧化物 ([[(1,1,3,3-tetramethylbutyl)cre-soxy]ethoxy]ethyl]dimethylbenzylammonium

hydroxide(DEBDA 氢氧化物)(Ballas 等, (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 939, 8-18), 溴化十六烷基三甲铵(CTAB)/DOPE 混合物(Pinnaduwege 等, (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 985, 33-37), 谷氨酸(TMAG)与 DOPE、CTAB、DEBDA、二-十二烷基溴化铵(DDAB)形成的亲脂性二酯, 乙基硬脂胺与磷脂酰乙醇胺形成的混合物 (Rose 等, (1991) *Biotechnology* 10, 520-525), DDAB/DOPE(TransfectACE, 吉布科公司(GIBCO BRL)), 以及带寡半乳糖的脂质。可提高转染效率的典型转染增强试剂包括, 例如, DEAE-葡聚糖、聚凝胺、溶酶体破裂肽(Ohmori N I 等, *Biochem Biophys Res Commun* 1997/6/27; 235(3):726-9)、软骨素(chondroitin)基蛋白聚糖、硫酸化的蛋白聚糖、聚乙烯亚胺、多聚赖氨酸(Pollard H 等, *J Biol Chem*, 1998 273(13):7507-11)、整合素结合肽 CYGGRGDTP、线性葡聚糖九糖、甘油、系于寡核苷酸 3'端内部核苷连接上的胆固醇基(Letsinger, R. L. 1989 *Proc Natl Acad Sci USA* 86:(17):6553-6)、溶血磷脂、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺和 1-油酰基溶血磷脂酰胆碱。

在某些情况下, 比较理想的是用直接将核酸与将含核酸载体导向靶细胞的试剂一起递送。这种“靶向”分子包括靶细胞表面膜蛋白特异性抗体或靶细胞受体的配基。如果使用脂质体, 可与胞吞作用相关的细胞表面膜蛋白结合的蛋白可用于靶向到细胞和/或促进摄取。这种蛋白的例子包括特定细胞类型向性的壳蛋白及其片段、在循环中经历内化的蛋白的抗体、以及用于胞内定位和提高胞内半衰期的蛋白。在其他实施方式中, 可以利用受体介导的胞吞作用。这种方法可见于, 例如, Wu 等, 1987 或 Wagner 等, 1990 的描述。有关目前已知的基因标记和基因治疗方法的综述可参见 Anderson 1992。也可参见 WO 93/25673 及其引用的参考文献。有关基因治疗技术的其他综述可参见 Friedmann, *Science*, 244:1275-1281(1989); Anderson, *Nature*, 392 卷的增刊, 6679, 25-30 页(1998); Verma, *Scientific American*:68-84(1990); 以及 Miller, *Nature*, 357:455-460(1992)。

### 筛选方法

本发明的另一方面涉及鉴定能够提高 EphB3 活性的抗体的方法, 该方法包括使 EphB3 与抗体接触, 确定抗体是否能够调节 EphB3 的活性。比较存在被测抗体时的活性与不存在被测抗体时的活性。如果包含被测抗体的样品的活

性比不含被测抗体的样品的活性高则说明抗体能激活或提高该活性。有效治疗药物依赖于鉴定出缺乏明显毒性的有效治疗剂。可利用本领域熟知的方法根据结合活性来筛选抗体。例如，凝胶位移分析、蛋白质印迹、放射性标记的竞争分析、利用色谱共分馏、共沉淀、交联、ELISA 等都可以使用，这些方法见于，例如，《新编分子生物学实验指南》(Current Protocols in Molecular Biology)(1999)，纽约约翰威利父子公司(John Wiley & Sons, NY)，本文都已完整纳入作为参考。另外，Biacore®可用于评价抗体竞争(参见例如，下面的实施例 5)。

为了初步筛选能与靶抗原上目的表位结合的抗体，可进行常规的交叉封闭试验，如《抗体，实验室手册》(Antibodies, A Laboratory Manual)，冷泉港实验室出版社，Harlow 和 David Lane 编辑(1988)所描述的。也可以采用常规的竞争结合试验，其中根据未知抗体抑制靶抗原与本发明的靶抗原特异性抗体结合的能力来确定未知抗体的特征。完整抗体、其片段如胞外域或者线性表位也可以使用。表位绘图方法可参见 Champe 等，J. Biol. Chem. 270:1388-1394(1995)的描述。

在体外结合试验的一个变体中，本发明提供了一种方法，该方法包括步骤(a)使固定的 EphB3 与候选抗体接触以及(b)检测候选抗体与 EphB3 的结合。在另一个实施方式中，候选抗体被固定，并检测 EphB3 的结合。固定可利用本领域熟知的方法完成，其中包括共价结合到支持物、小珠或色谱树脂上，以及非共价高亲和力的相互作用如抗体结合，或者使用链亲和素/生物素结合，其中被固定的化合物包含生物素基序。结合的检测可通过如下方法完成(i)利用未固定的化合物上的放射性标记物，(ii)利用非固定化合物上的荧光标记物，(iii)利用非固定化合物免疫特异性抗体，(iv)利用未固定的能激发荧光素支持物的化合物上的标记物，其中固定的化合物被连接在荧光素支持物上，以及本领域熟知的和常规使用的其他技术。

能增强靶抗原活性的抗体可通过如下方法鉴定：使候选抗体与靶抗原(或表达靶抗原的细胞)共孵育，确定候选抗体对靶抗原的活性或表达水平的影响。比较存在被测抗体时的活性与不存在被测抗体时的活性。如果包含被测抗体的样品的活性比不含被测抗体的样品的活性高则说明抗体具有增强活性。调节靶



抗原多肽或多聚核苷酸活性的抗体的特异性可通过比较其对靶抗原的效应与其他相关化合物的效应来评价。

在特殊的典型实施方式中,本发明涉及通过测定抗体诱导受体磷酸化、寡聚化、内化、降解、信号转导和/或 EphB3-介导的细胞粘附的能力,评价它们在细胞培养体系中的功效。另外,细胞试验包括本文所述的增殖试验、软琼脂试验和/或细胞毒试验可用于评价特定的 EphB3 抗体。

特定抗体或抗体组合的生物学活性可利用合适的动物模型通过体内试验来评价。例如,可以利用异种移植癌症模型,其中人癌细胞被输入到免疫削弱动物如裸鼠或 SCID 小鼠体内。通过测定肿瘤形成、肿瘤消退或转移等被抑制的水平来预测疗效。

本发明还涉及高通量筛选(HTS)试验,用于鉴定能与靶抗原相互作用的抗体或者能提高诱导靶抗原生物学活性(即诱导内化或胞内信号转导等)的抗体。HTS 试验能以一种高效的方式筛选大量化合物。本发明包括利用以细胞为基础的 HTS 系统研究靶抗原与其结合伙伴之间的相互作用。设计出的 HTS 试验可用于鉴定具有理想特性的“采样化合物”或“先导化合物”,可以对这些化合物进行修饰以改善其所需特性。

在本发明的另一实施方式中,利用了高通量的筛选方法来筛选与靶抗原多肽具有合适结合亲和力的抗体片段或 CDR 内有 1、2、3 或更多氨基酸修饰的 CDR。

### **联合治疗**

目前已经鉴定出了多个在动物模型中有效的抗体,但是如果将两种或多种这类抗体混合在一起(结合相同的或不同的靶抗原)就可能提供更好的疗效。可以将包含一种或多种抗体的组合物给予患有癌症或者易患癌症的人或哺乳动物。同时给予两种治疗剂并不是说要在一个时间点同时给药,只要两种药物发挥其疗效的时间段有重合就可以。也可以同时或先后给药,例如隔不同的天数或不同的周数给药。

虽然抗体治疗适用于所有阶段的癌症,但是抗体治疗特别适于晚期癌症或转移癌。还未进行过化疗的患者优选采用抗体疗法和化疗或放疗的联合治疗,那些接受过一次或多次化疗的患者也适于抗体治疗。另外,抗体治疗也能减少

同时使用的化疗的给药剂量，特别是对于那些无法良好耐受化疗药物的毒性的患者来说。

本发明的方法包括给予单一抗体以及给予不同抗体的组合或“混合物”。这种抗体混合物具有某些优势，因为抗体混合物包含能发挥不同效应机制的抗体，或者是细胞毒抗体与依赖免疫效应功能的抗体的直接组合。组合物中的这种抗体具有协同疗效。

本发明方法还考虑到给予单一抗体或抗体混合物与医学上认可的所治疗特定癌症(如肺癌、卵巢癌、食道癌、结肠癌或乳腺癌)的标准护理联合进行。

细胞毒药物是指能抑制或阻断细胞功能和/或导致细胞破坏的物质。该术语包括放射性同位素(例如， $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、 $Y^{90}$ 和 $Re^{186}$ )、化疗药物和毒素如细菌、真菌、植物和动物来源的酶促活化毒素或者合成毒素或其片段。非细胞毒剂是指不会抑制或阻断细胞功能和/或导致细胞破坏的物质。非细胞毒剂包括经过活化后变成细胞毒性的试剂。非细胞毒剂包括小珠、脂质体、基质或颗粒(参见，例如，美国专利出版号 2003/0028071 和 2003/0032995，本文已纳入作为参考)。这种试剂可与本发明的抗体缀合、偶联、结合或相连。

癌症化疗药物包括而限于烷化剂如卡铂和顺铂；氮芥类烷化剂；亚硝脲类烷化剂如卡莫司汀(BCNU)；抗代谢药如甲氨蝶呤；亚叶酸；嘌呤类似物抗代谢药如氟尿嘧啶(5-FU)和吉西他滨(Gemzar®)；激素类抗肿瘤药如戈舍瑞林、亮丙瑞林和他莫昔芬；天然抗肿瘤药如阿地白介素、IL-2、多西紫杉醇、依托泊甙(VP-16)、干扰素 $\alpha$ 、紫杉醇(Taxol®)和维甲酸(ATRA)；抗生素天然抗肿瘤药如博来霉素、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、道诺霉素和丝裂霉素包括丝裂霉素 C；以及长春花碱天然抗肿瘤药如长春碱、长春新碱、长春地辛；羟基脲；醋葡醛内酯、阿霉素、异环磷酰胺、依诺他滨、环硫雄醇、阿柔比星、安西他滨、尼莫司汀、盐酸丙卡巴肼、卡巴醌、卡铂、卡莫氟、色霉素 A3、抗肿瘤多糖、抗肿瘤血小板因子、环磷酰胺(Cytosin®)、施佐菲兰、阿糖胞苷(胞嘧啶阿糖胞苷)、达卡巴嗪、硫代肌苷、塞替派、喃氟啶、多拉司他汀、多拉司他汀类似物如奥瑞斯他汀、CPT-11(伊立替康)、米托蒽醌、长春瑞滨、替尼泊苷、氨基蝶呤、洋红霉素、埃斯波霉素(参见，例如，美国专利号 4,675,187)、新制癌菌素、OK-432、博来霉素、氟铁龙、溴甙、白消安、二磷酸己烯雌酚四

钠、培洛霉素、苯丁抑制素(Ubenimex®(乌苯美司))、干扰素 $\beta$ 、美雄烷、二溴甘露醇、美法仑、层粘连蛋白肽、香菇多糖、采绒革盖菌提取物、喃氟啉/尿嘧啶、雌氮芥(雌激素/氮芥)。

另外,可用于治疗肿瘤患者的其他药物包括EPO、G-CSF、更昔洛韦;抗生素、亮丙瑞林;哌替啶;齐多夫定(AZT);白细胞介素1到18,其中包括突变体和类似物;干扰素或细胞因子,如干扰素 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ ;激素如促黄体激素释放激素(LHRH)及其类似物和促性腺激素释放激素(GnRH);生长激素如转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、生长激素释放因子(GHRF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子同源因子(FGFHF)、肝细胞生长因子(HGF)和胰岛素生长因子(IGF);肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和 $\beta$ (TNF- $\alpha$ 和 $\beta$ );侵入抑制因子-2(IIF-2);骨形态发生蛋白1-7(BMP1-7);生长抑素;胸腺素- $\alpha$ -1; $\gamma$ -球蛋白;超氧化物歧化酶(SOD);补体因子;抗血管生成因子;抗原性物质;以及前药。

前药是指具有药理活性的物质的前体或衍生物,与亲本药物相比前药对肿瘤细胞的毒性较低或者无毒性,但是能够被催化活化或者转化成有活性的或者比亲本药物活性更高的形式。参见,例如,Wilman,“癌症化疗的前药”(“Prodrugs in Cancer Chemotherapy”) *Biochemical Society Transactions*, 14, 375-382页,615届贝尔法斯特会议(1986)和Stella等,“前药:靶向性药物转移的化学方法”(“Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,”),《定向药物转移》(Directed Drug Delivery), Borchardt等,(编辑),247-267页,Humana Press(1985)。前药包括而限于包含磷酸盐的前药、包含硫代硫酸盐的前药、包含硫酸盐的前药、包含肽的前药、D氨基酸修饰的前药、糖基化的前药、包含 $\beta$ -内酰胺的前药、包含任选取代苯氧乙酰胺的前药或包含任选取代苯乙酰胺的前药、可转化为细胞毒活性更高的游离药物的5-氟胞嘧啶和其他5-尿嘧啶前药。可用于本发明的可转化成前药形式的细胞毒药物的例子包括而限于上述化疗药物。

### 给药及制备

本发明的抗体可制成包含适用于理想给药方法的载体的药物组合物。合适的载体包括与抗体组合时能保持抗体的理想活性并且不与患者免疫系

统发生反应的任何材料。载体的例子包括而不限于标准药理学上可接受的载体中的任何一种，如无菌磷酸缓冲盐溶液、抑菌水等。各种水性载体也可以使用，例如，水、缓冲水、0.4%盐水、0.3%甘氨酸等，还包括可增强稳定性的其他蛋白，如白蛋白、脂蛋白、球蛋白等，这些物质可对制剂产生温和的化学修饰效应等。

抗体的治疗性制剂可通过使具有理想纯度的抗体与任选生理性载体、赋形剂或稳定剂混合而制备以便于储存(《雷明顿药理学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) 第16版, Osol, A.编辑, (1980)), 制剂可以是冻干制剂或水溶液。合适的载体、赋形剂或稳定剂在应用剂量和浓度下对受者是无毒的, 其中包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸; 包含维生素C和甲硫氨酸的抗氧化剂; 防腐剂(如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵; 氯己双铵; 苯扎氯铵; 苯酚、丁醇或苯甲醇; 烷基对羟苯甲酸如甲基或丙基对羟苯甲酸; 儿茶酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 以及m-甲酚); 低分子量(少于约10个残基)的多糖; 蛋白质如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、双糖和其他糖类如葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂如EDTA; 糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐抗平衡离子如钠; 金属复合物(例如, Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂如吐温™、普罗流尼™或聚乙二醇(PEG)。

本文的制剂还包含特定治疗用途所必须的多个活性化合物, 尤其是具有补充活性并且互相之间没有反作用的那些化合物。这些分子适于以能达到预定目的的有效量组合存在。

活性组分还可以包裹在微囊中, 例如, 通过凝聚技术或界面聚合制备的微囊, 如胶体药物转运系统(例如, 脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米微囊)或粗滴乳状液中分别存在的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚甲基甲酰胺微囊。这种技术在《雷明顿药理学》第16版, Osol, A.编辑, (1980)中有描述。

可用于体内给药的制剂必须是无菌的。通过无菌滤膜过滤可以很容易实现这一点。

抗体可以合适的方式给药,其中包括胃肠外途径、皮下注射、腹膜内注射、肺内给药和鼻内给药,如果需要局部治疗也可以采用损伤部位内给药。胃肠外输注包括静脉注射、动脉内注射、腹膜内注射、肌肉注射、真皮内注射或皮下注射。另外,抗体也适于通过脉冲输注方式给药,尤其是抗体给药剂量不断下降时。优选通过注射给药,最优选的是通过静脉或皮下注射给药。本发明也包括其他给药方法,如局部给药,特别是透皮给药、透粘膜给药、直肠给药、口服或局部给药,例如,通过靠近目的部位的导管。

对于鼻腔粘膜给药来说,药学上可接受的制剂和药物可以是喷雾剂或气溶胶,其中包含合适的溶剂和任选其他化合物,例如但不限于稳定剂、抗菌剂、抗氧化剂、pH调节剂、表面活性剂、生物利用度调节剂以及上述物质的组合。气溶胶制剂推进剂包括压缩空气、氮气、二氧化碳或以烃类物质为基础的低沸点溶剂。

可注射的制剂一般包括水性悬液或油性悬液,这些溶液可利用合适的分散剂或湿润剂和悬浮剂制备。可注射的制剂可位于溶液相中,或者以悬液的形式,用溶剂或稀释剂制备。药学上可接受的溶剂或载体包括无菌水、林格液或等渗的盐水溶液。

如果用于注射,药学上可接受的制剂和/或药物可以是适于用上述合适的溶液重组成的粉末。其中包括而限于冷冻干燥的、旋转干燥的或喷雾干燥的粉末、无定形粉末、颗粒、沉淀物或微粒。用于注射时制剂任选可包含稳定剂、pH调节剂、表面活性剂、生物利用度调节剂以及上述物质的混合。

也可以制备缓释制剂。合适的缓释制剂的例子包括包含抗体的固相疏水聚合物的半透性基质,这种基质可以具有固定的形状,例如,膜或微囊。缓释基质的例子包括聚酯类、水凝胶类(例如,聚(2-羟乙基甲基丙烯酸酯)或聚乙烯醇)、聚乳酸(美国专利号 3,773,919)、L-谷氨酸和  $\gamma$ -乙基-L-谷氨酸的共聚物、不能降解的乙烯醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟乙酸共聚物如 Lupron Depot™(由乳酸-羟乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球),以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然聚合物如乙烯醋酸乙烯酯和乳酸-羟乙酸可

以使分子的释放时间达到 100 天以上，但是某些水凝胶维持蛋白释放的时间却较短。当包裹的抗体在体内存在较长时间时，抗体会因长期暴露于 37°C 湿润环境中而变性或凝集，结果导致生物学活性丧失，免疫原性可能会改变。可以根据参与的机制来设计合理的策略以使抗体稳定。例如，如果发现凝集是由硫-二硫化物交换而形成的分子间二硫键导致的，那么就可以通过修饰巯基残基、在酸溶液中冷冻干燥、控制含湿量、使用合适的添加物以及开发特异性的聚合物基质组合物来达到稳定的目的。本领域熟知的其他策略也可以使用。

本发明的制剂可以是短效的、速释的、长效的或缓释的，如本文所述。药学上可接受的制剂也可以制备成控释或缓释的形式。

即释组合物还可包含，例如，微粒或脂质体或某些其他包裹形式，或者以缓释形式给药以延长保存时间和/或转移效应。因此，药学上可接受的制剂和药物可压缩成片剂或圆柱形，作为仓储式注射剂或植入物如支架植入肌肉内或皮下。这种植入物可利用已知的惰性材料如聚硅酮和生物可降解聚合物。

除了上述那些典型制剂形式以外，药学上可接受的赋形剂和载体也是本领域技术人员熟知的，也可以包含在本发明中。这种赋形剂和载体描述于，例如，《雷明顿药学》第 16 版，Osol, A.编辑，(1980)中，本文已纳入作为参考。

根据患者的疾病状况、年龄、体重、一般健康状况、基因型、性别和饮食、给药间隔时间、给药途径、排泄率以及合并用药来调节特殊剂量。上述包含有效量的所有剂型都在常规试验的范围内，因此也包括在本发明的范围之内。

本发明的抗体制剂可基本不含其他天然免疫球蛋白或其他生物分子。优选的抗体在给予肿瘤患者或者易患肿瘤的患者时毒性很小。

本发明的组合物可通过常规的已知灭菌技术除菌。得到的溶液包装起来直接使用，或者在无菌状态下过滤并冻干，在给药前用无菌溶液溶解冻干制剂。组合物可包含接近生理调节所必须的药学上可接受的辅助物质，如 pH 调节和缓冲剂、张力调节剂等，例如，乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯

化钾、氯化钙和稳定剂(例如 120%麦芽糖等)。

本发明的抗体可通过脂质体给药, 脂质体是由各种脂质和/或磷脂和/或表面活性剂组成的小载体, 可用于转移药物(例如, 本文所述的抗体, 和任选化疗药物)。脂质体包括乳化剂、泡沫、微粒、不溶性的单层、磷脂分散液、板状层等, 可以作为载体将抗体靶向到特定组织以及提高组合物的半衰期。许多方法都可用于制备脂质体, 如美国申请号 4,837,028 和 5,019,369 所述, 本文已纳入作为参考。

包含抗体的脂质体可用本领域已知的方法制备, 如 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)以及美国申请号 4,485,045 和 4,544,545 所描述的。循环时间延长的脂质体在美国专利号 5,013,556 中有描述。特别适用的脂质体可利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物通过反相蒸发法制备。通过确定孔径的滤膜挤出可得到具有理想直径的脂质体。本发明抗体的 Fab'片段可通过二硫交换反应连接到脂质体上, 如 Martin 等, J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)所述。任选是, 化疗药物(如多柔比星)也可以包裹到脂质体内[参见, 例如, Gabizon 等, J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)]。

这些组合物中的抗体浓度范围可以很宽, 即, 重量百分比从低于约 10%, 通常是至少约 25%, 到高达 75%或 90%, 使用何种浓度主要根据液体体积、粘度等以及所选择的特定给药模式来确定。制备可通过口服、局部给药和胃肠外途径给药的组合物的实际制备方法是本领域技术人员所熟知的, 详细描述参见《雷明顿药学》第 19 版, Mack Publishing Co., Easton, PA(1995), 本文已纳入作为参考。

通过本领域熟知的标准经验方法可以确定治疗患者疾病所需的本发明组合物的有效量。

足以达到此目的的剂量被定义为“治疗有效量”。抗体的有效量可根据疾病的严重程度以及被治疗患者的体重和一般状况而作出调整, 但是一般在每公斤体重约 1.0  $\mu\text{g}$  到 100 mg 之间。典型的剂量范围为每次给予约 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  到约 30 mg/kg、或约 0.1 mg/kg 到约 20 mg/kg 或约 1 mg/kg 到约 10

mg/kg。还可以根据体表面积计算抗体的给药剂量(例如,最高可达 4.5 g/m<sup>2</sup>)。抗体的其他典型剂量包括单次给药总剂量高达 8g(假设体重为 80 kg 或体表面积为 1.8 m<sup>2</sup>)。

可以通过本领域熟知的任何方式给药。例如,抗体可以一个或多个分次给药的方式给药,或者通过在一段时间内,例如,5、10、15、30、60、90、120 分钟或更长时间内,短期或长期输注给药。经过初始治疗期后,根据患者的反应及对治疗的耐受情况,如果需要维持患者的反应,可以给予维持剂量,例如,每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每两月一次、每三月一次或每六月一次。最常用的治疗方案是根据需要随时调整给药剂量,直到疾病症状的改善达到理想的效果。通过常规技术和试验可以很容易地监测治疗的进程。治疗可进行一个确定的时段,或者长期和持续进行数年,直到疾病恶化或者患者死亡。

可根据主治医师所选择的给药剂量和给药模式单次或多次给予组合物。当用于预防或治疗疾病时,抗体的合适给药剂量要根据如下因素确定:如上所述的被治疗的疾病类型、疾病的严重程度和进程、抗体给药的目的是为了预防或治疗、用药史、患者的病史和对抗体的反应以及主治医师的判断。抗体适于在一个时间点或者通过一系列治疗来给予患者。

在任何情况下,一段时间内制剂所提供的治疗性抗体的量都应该足以产生理想的生物学活性,例如,抑制癌症或使癌症的严重程度降到最低。本发明的组合物可单独给药,也可以作为辅助治疗方法与本领域已知的用于治疗这种疾病的其他治疗方法一起使用。

抗体组合物应按照 GMP 的标准制剂、给药和管理。因此需要考虑的因素包括特定适应症、特定适用哺乳动物、各个患者的临床状况、病因、给药部位、给药方法、给药方案、以及主治医师所熟知的其他因素。要根据这些因素来确定抗体的治疗有效量,并且应该是预防、抑制或治疗靶位介导的疾病所必须的最小剂量。这种剂量优选低于会对宿主造成毒性或者使宿主对感染更敏感的剂量。

虽然不是必须的,但是抗体也可以和目前所用的预防或治疗疾病的一种或多种药物一起制成制剂。这种其他药物的有效量要根据制剂中存在的



抗体量、疾病或治疗的类型、以及上面所讨论的其他因素而定。这些药物通常用于同一给药剂量中，并通过上文所述的给药途径给药，或者约占迄今为止所用剂量的 1 到 99%。

在本发明的另一实施方式中，提供了制品，其中包括用于治疗适应症的材料。制品包含容器和标签。合适的容器包括，例如，瓶子、小瓶、注射器和试管。容器可用各种材料制造，如玻璃或塑料。容器内包含的组合物可有效治疗疾病，容器有一个无菌接口(例如，容器可以是静脉注射袋或能被皮下注射针头刺穿的塞子)。组合物中的活性成分是本发明的抗体。容器上或与容器相连的标签说明了组合物可用于治疗所选择的疾病。制品还包含第二容器，其中含有第二治疗性药物(包括用于治疗本文所讨论的或本领域已知的疾病的任何第二治疗性药物)。制品还可以包含其他容器，其中含有药学上可接受的缓冲液，如磷酸盐缓冲液、林格式液或葡萄糖溶液，用于重组成冻干的抗体制剂。制品还可以包含其他材料，这些材料从生产商和用户的观点来看是必须的，其中包括其他缓冲液、稀释剂、滤膜、针头、注射器和包装说明书。

### 免疫治疗

可用于治疗癌症患者的抗体包括能起始有效抗肿瘤免疫应答的那些抗体以及能直接产生细胞毒作用的那些抗体。与细胞毒药物连接的抗体可用于将细胞毒药物靶向到表达 EphB3 的肿瘤组织内。另外，抗体可通过补体介导的或抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)机制诱导肿瘤细胞的溶解，两种机制都需要与效应细胞 Fc 受体位点或补体蛋白产生相互作用的免疫球蛋白分子完整的 Fc 部分。另外，对肿瘤生长有直接生物效应的抗体也可用于实现本发明。这种细胞毒抗体发挥作用的潜在机制包括抑制细胞的生长、调控细胞的分化、调控肿瘤血管生成因子的表达模式、以及诱导凋亡。特定抗体产生抗肿瘤效应的机制可通过确定 ADCC、ADMMC、补体介导的细胞溶解等的体外试验来分析，这是本领域所熟知的。

抗 EphB3 抗体可以其“裸露”抗体或未连接形式给药，也可以直接连接到其他治疗或诊断剂上，或者间接连接到包含这种其他治疗或诊断剂的载体聚合物上。

抗体可用放射性同位素、亲和力标记物(如生物素、链亲和素等)、酶标记物(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光素或化学发光或生物发光标记物(如 FITC 或罗丹明等)、顺磁性原子等进行可检测标记。完成这种标记的方法是本领域熟知的;例如,参见(Sternberger, L.A.等, *J. Histochem. Cytochem.* 18: 315(1970); Bayer, E.A.等, *Meth. Enzym.* 62:308(1979); Engval, E.等, *Immunol.* 109:129(1972); Goding, J.W. *J. Immunol. Meth.* 13:215(1976))。

抗体基序的连接可见于美国专利号 6,306,393 的描述。通用技术也可见于 Shih 等, *Int. J. Cancer* 41:832-839(1988); Shih 等, *Int. J. Cancer* 46: 1101-1106 (1990)和 Shih 等, 美国专利号 5,057,313 的描述。这种通用方法包括使包含氧化糖链部分的抗体组分与包含至少一个游离氨基并且携带有一群药物、毒素、螯合剂、硼附加物或其他治疗剂的载体聚合物反应。这个反应可产生初始希夫碱(亚胺)连接,通过还原成仲胺后得以稳定并形成最后的偶联物。

载体聚合物可以是,例如,氨基葡聚糖(aminodextran)或至少包含 50 个氨基酸残基的多肽。用于将药物或其他试剂连接到载体聚合物上的各种方法都是本领域所熟知的。多肽载体可用于取代氨基葡聚糖,但是多肽载体的多肽链应该包含至少 50 个氨基酸残基,优选 100-5000 个氨基酸残基。其中至少有一些氨基酸应该是赖氨酸残基或谷氨酰胺或天冬氨酸残基。赖氨酸的悬垂氨基以及谷氨酰胺和天冬氨酸的悬垂羧基适于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其他治疗剂。合适多肽载体的例子包括多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚天冬氨酸、上述氨基酸的共聚物以及这些氨基酸和能赋予加载载体和偶联物理想溶解特性的其他氨基酸如丝氨酸的混合聚合物。

另外,结合抗体可通过将抗体组分与治疗剂直接连接来制备。通用方法与间接连接方法相似,只是治疗剂是直接连接到氧化抗体组分上。例如,抗体的糖链基序连接到聚乙二醇上以延长半衰期。

另外,治疗剂可通过二硫键的形成或通过使用异源双功能交联子如 N-琥珀酰-3(2-联硫基吡啶)-丙酸盐(SPDP)连接到还原抗体的铰链区。Yu 等, *Int. J. Cancer* 56:244(1994)。用于这种连接的通用技术是本领域熟知的。参见,例如, Wong, 《蛋白质结合和交联化学》(Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking)(CRC 出版社(CRC Press) 1991); Upešlacis 等,“化学方法修饰抗

体”(“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”), 《单克隆抗体:原理及应用》(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications), Birch 等, (编辑), 187-230 页(Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, “合成肽来源的抗体的制备和特征”(“Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,”), 《单克隆抗体:制备、改造及临床应用》(Monoclonal Antibodies:Production, Engineering and Clinical Application), Ritter 等, (编辑), 60-84 页(剑桥大学出版社(Cambridge University Press) 1995)。各种双功能蛋白偶联剂都是本领域熟知的, 如 N-琥珀酰-3(2-联硫基吡啶)-丙酸盐(SPDP)、亚氨基硫烷(iminothiolane) (IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如盐酸脂肪酸二甲酯(dimethyl adipimidate HCL))、活性酯类(如辛二酸二琥珀酸亚胺)、醛类(如戊醛(glutareldehyde))、叠氮化合物(如双(对-叠氮苯甲酰)己二胺)、二叠氮衍生物(如双-(对-重氨基苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸盐(如甲苯 2,6-二异氰酸酯)以及双活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

最后, 可以构建包含一种或多种抗 EphB3 抗体基序和另一多肽的融合蛋白。制备抗体融合蛋白的方法是本领域熟知的。参见, 例如, 美国专利号 6,306,393。包含 IL-2 基序的抗体融合蛋白在 Boleti 等, Ann. Oncol. 6:945(1995), Nicolet 等, Cancer Gene Ther. 2:161(1995), Becker 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 93:7826(1996), Hank 等, Clin. Cancer Res. 2:1951(1996)和 Hu 等, Cancer Res. 56:4998(1996)中有描述。

本发明抗体可以“裸露”或非偶联形式给药, 或可与治疗剂偶联。在一个实施方式中, 本发明的抗体可用作放射增敏剂。在这种实施方式中, 抗体与放射增敏剂相连。术语“放射增敏剂”在本文中是指一种分子, 优选低分子量的分子, 当以治疗有效量的剂量给予动物时可提高被放射增敏细胞对电磁辐射的敏感性和/或提高可用电磁辐射治疗的疾病的疗效。可用电磁辐射治疗的疾病包括肿瘤性疾病、良性和恶性肿瘤以及癌细胞。

本文所用的术语“电磁辐射”和“辐射”包括而限于波长为  $10^{-20}$  到 100 米的射线。本发明的优选实施方式利用电磁辐射  $\gamma$  辐射( $10^{-20}$  到  $10^{-13}$  m)、X 射线辐射( $10^{-12}$  到  $10^{-9}$  m)、紫外光(10 nm 到 400 nm)、可见光(400 nm 到 700 nm)、红外线辐射(700 nm 到 1.0 mm)以及微波辐射(1 mm 到 30 cm)。

已知放射增敏剂可提高癌细胞对电磁辐射毒性效应的敏感性。目前许多癌症治疗方案都利用可被 X 射线电磁辐射活化的放射增敏剂。X 射线活化的放射增敏剂的例子包括而不限于：甲硝唑、醚醇硝唑、去甲基醚醇硝唑、哌莫硝唑、依他硝唑、硝唑吗啉、丝裂霉素 C、RSU1069、SR423、EO9、RB6145、尼克酰胺、5-溴脱氧尿苷(BUdR)、5-碘脱氧尿苷(IUdR)、溴脱氧胞苷、氟脱氧尿苷(FUdR)、羟基脲、顺铂以及上述物质治疗有效性的类似物及衍生物。

癌症的光敏疗法(PDT)利用可见光作为致敏剂的辐射活化剂。光促辐射增敏剂的例子包括而不限于血卟啉衍生物、光卟啉(r)、苯-卟啉衍生物、NPe6、锡本卟啉(SnET2)、脱镁叶绿甲酯酸-a(pheorbide-a)、细菌叶绿素-a、萘花青(naphthalocyanine)、酞菁、锌酞菁以及上述物质治疗有效性的类似物和衍生物。

在另一实施方式中，抗体可与肿瘤预靶向治疗所用的受体(如抗生物素蛋白链菌素)连接，其中抗体-受体偶联物被给予患者，然后利用清除药物从循环中清除未结合的偶联物，再给予连接有细胞毒药物(如放射性核素)的配基(如，亲和素)。

本发明还提供可检测标记形式的上述抗体。可利用放射性同位素、亲和标记物(如生物素、亲和素等)、酶标记物(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等)、荧光或发光或生物发光标记物(如 FITC 或罗丹明等)、顺磁性原子等可检测地标记抗体。本领域熟知进行标记的方法；参见例如(Sternberger, L.A.等, *J. Histochem. Cytochem.* 18:315 (1970); Bayer, E.A.等, *Meth. Enzym.* 62:308 (1979); Engval, E.等, *Immunol.* 109:129 (1972); Goding, J.W. *J. Immunol. Meth.* 13:215 (1976))。

“标记物”是指与抗体直接或间接连接的可检测化合物或组合物。标记物可以是本身就是可以被检测的标记物(如，放射性同位素标记物或荧光素标记物)，或者可催化可检测底物化合物或组合物发生化学改变的酶标记物。另外，标记物本身可能是不能被检测的，但却是被可检测的另一种试剂结合的元素(例如，表位标签或结合伙伴对中的一个，如生物素-亲和素等)。因此，抗体可包含有利于其分离的标记物或标签，本发明的鉴定抗体的方法包括通过与标记物或标签的相互作用分离抗体的方法。

典型的治疗性免疫偶联物包括连接有细胞毒剂如化疗药物、毒素(例如，

细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活化毒素或其片段)或放射性同位素(即,放射性偶联物)的本文所述的抗体。融合蛋白将在下文作进一步描述。

免疫偶联物的产生方法参见美国专利 6,306,393。可将治疗剂间接偶联于抗体组分,以制备免疫偶联物。通用技术参见 Shih 等, *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih 等, *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); 和 Shih 等, 美国专利 5,057,313。通用方法包括使具有氧化糖部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团的载体聚合物发生反应,载体聚合物上载有多种药物、毒素、螯合物、硼附加物或其它治疗剂。此反应产生初始的席夫碱(胺)连接,可通过还原成仲胺稳定该连接,形成最终的偶联物。

载体聚合物优选为氨基葡聚糖或至少 50 个氨基酸残基的多肽,但也可采用其它基本上等同的聚合物载体。优选地,最终的免疫偶联物可溶解于水溶液,如哺乳动物血清,以易于给药和在治疗应用中有效靶向。因此,载体聚合物的增溶能力能提高最终免疫偶联物的血清溶解度。具体说,优选氨基葡聚糖。

制备与氨基葡聚糖形成的免疫偶联物的方法一般从葡聚糖聚合物开始,葡聚糖的平均分子量最好约为 10,000-100,000。使葡聚糖与氧化剂反应,以影响其糖环的一部分发生受控氧化形成醛基。可按照常规步骤,利用糖醇解化学试剂如  $\text{NaIO}_4$  方便地进行这种氧化。

然后,氧化的葡聚糖与多胺,优选二胺,更优选单羟基或多羟基二胺反应。合适的胺包括乙二胺、丙二胺或其它类似的聚亚甲基二胺,二亚乙基三胺或类似的多胺,1,3-二氨基-2-羟基丙烷或其它类似的羟基化二胺或多胺,等等。利用相对于葡聚糖的醛基而言过量的胺保证醛官能团完全转化为席夫碱基团。

利用还原剂,如  $\text{NaBH}_4$ 、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$  等使得到的席夫碱中间体还原稳定化。可通过常规大小排阻柱纯化得到的加合物,以去除交联的葡聚糖。

也可采用衍生葡聚糖以引入胺官能团的其它常规方法,例如与溴化氰反应,然后与二胺反应。

然后,氨基葡聚糖与准备加载的活性形式的特定药物、毒素、螯合剂、免疫调节剂、硼附加物或其它治疗剂的衍生物反应,形成中间体加合物;所述衍生物优选羧基活化衍生物,是通过常规方式,例如使用二环己基碳二亚胺(DCC)或其水溶性变体制备的。

或者,可通过戊二醛缩合或蛋白质上活化羧基与氨基葡聚糖上胺基的反应使多肽毒素如美洲商陆抗病毒蛋白或蓖麻毒蛋白 A 链等偶联于氨基葡聚糖。

放射性金属或磁共振增强剂的螯合剂是本领域熟知的。比较典型的有乙二胺四乙酸(EDTA)和二乙烯三胺五乙酸(DTPA)的衍生物。这些螯合剂一般在侧链上都含有基团,螯合剂通过这些基团连接到载体上。这些基团包括,例如,异硫氰酸苄酯,DTPA 或 EDTA 通过该基团偶联到载体的氨基上。另外,螯合剂上的羧基或氨基可通过活化或先衍生化然后偶联而连接到载体上,所有这些都是通过已知的方式完成的。

硼附加物如碳硼可通过常规方法连接到抗体上。例如,用悬垂侧链上的羧基制备碳硼,这也是本领域所熟知的。这种碳硼与载体如氨基葡聚糖的连接可通过碳硼的羧基活化并与载体上的胺缩合来完成,形成有治疗作用的免疫偶联物,如下文所述。

多肽载体可用于取代氨基葡聚糖,但是多肽载体的多肽链应该包含至少 50 个氨基酸残基,优选 100-5000 个氨基酸残基。其中至少有一些氨基酸应该是赖氨酸残基或谷氨酰胺或天冬氨酸残基。赖氨酸的悬垂氨基以及谷氨酰胺和天冬氨酸的悬垂羧基适于连接药物、毒素、免疫调节剂、螯合剂、硼附加物或其他治疗剂。合适多肽载体的例子包括多聚赖氨酸、多聚谷氨酸、多聚天冬氨酸、上述氨基酸的共聚物以及这些氨基酸和能赋予加载载体和偶联物理想溶解特性的其他氨基酸如丝氨酸的混合聚合物。

通过氧化抗体的糖链部分、所得的醛(和酮)羰基与加载药物、毒素、螯合剂、免疫调节剂、硼附加物或其他治疗性药物的载体上的氨基反应可以影响中间偶联物与抗体组分的结合。另外,中间偶联物可通过加载治疗性药物的中间偶联物上引入的氨基连接到氧化抗体组分上。例如,与  $\text{NaIO}_4$  或其他糖醇解试剂进行化学反应,或者,例如,与神经氨酸苷酶和半乳糖氧化酶进行酶促反应可以很方便地影响氧化作用。对于氨基葡聚糖载体来说,并不是氨基葡聚糖的所有氨基都用于加载治疗性药物。氨基葡聚糖的剩余氨基与氧化的抗体组分缩合形成希夫碱加合物,然后通过还原而稳定,一般是用硼氢化物还原剂进行还原。

类似的方法可用于制备本发明的其他免疫偶联物。加载有多肽的载体优选

包含富余的游离酪氨酸残基,用于和抗体组分的氧化糖链部分缩合。如果需要,多肽载体上的羧基可转化成胺,例如,通过用 DCC 活化或者与过量的二胺(diamine)反应。

最终得到的免疫偶联物利用常规技术纯化,例如,在 Sephacryl S-300 上进行分子筛层析,或者用一个或多个 CD84Hy 表位进行亲和层析。

另外,免疫偶联物可通过将抗体组分与治疗剂直接连接来制备。通用方法与间接连接方法相似,只是治疗剂是直接连接到氧化的抗体组分上。

应当理解的是,其他治疗剂也可用螯合剂取代。本领域的技术人员无需特别的试验就可以制定出结合方案。

作为进一步的阐述,治疗剂可通过二硫键的形成连接到还原抗体组分的铰链区。例如,破伤风毒素肽可通过用于将肽连接到抗体组分上的单个半胱氨酸残基构建。另外,这种肽可用异源双功能交联子如 N-琥珀酰-3(2-联硫基吡啶)-丙酸盐(SPDP)连接到抗体组分上。Yu 等, *Int. J. Cancer* 56:244 (1994)。用于这种连接的通用技术是本领域熟知的。参见,例如, Wong, 《蛋白质结合和交联化学》(Chemistry Of Protein Conjugation and Cross-Linking) (CRC 出版社 1991); Upeslakis 等, “化学方法修饰抗体”(“Modification of Antibodies by Chemical Methods,”), 《单克隆抗体:原理及应用》(Monoclonal Antibodies:Principles and Applications), Birch 等, (编辑), 187-230 页(WL 公司 (Wiley-Liss, Inc.) 1995); Price, “合成肽来源的抗体的制备和特征”(“Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,”), 《单克隆抗体:制备、改造及临床应用》(Monoclonal Antibodies:Production, Engineering and Clinical Application), Ritter 等, (编辑), 60-84 页(剑桥大学出版社 1995)。

抗体与细胞毒剂的偶联物可通过各种双功能蛋白偶联剂如 N-琥珀酰-3(2-联硫基吡啶)-丙酸盐(SPDP)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如盐酸脂肪酸二甲酯)、活性酯类(如辛二酸二琥珀酸亚胺)、醛类(如戊醛)、叠氮化合物(如双(p-叠氮苯甲酰)己二胺)、二叠氮衍生物(如双-(p-重氮基苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸盐(如甲苯 2,6-二异氰酸酯)以及双活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)制备。例如,蓖麻蛋白免疫毒素可按照 Vitetta 等, *Science* 238:1098(1987)描述的方法制备。碳-14-标记的 1-异硫氰基苯基-3-甲基二乙烯

三胺五乙酸(MX-DTPA)是一种典型的用于将放射性核素偶联到抗体上螯合剂(参见,例如,WO94/11026)。

如上所述,抗体Fc区的糖链基序可用于偶联治疗剂。但是如果免疫偶联物的抗体组分用抗体片段,那么抗体片段可不包含Fc区。然而,在抗体或抗体片段的轻链可变区内引入糖链基序也是可能的。参见,例如,Leung等, *J. Immunol.* 154:5919(1995); Hansen等,美国专利号5,443,953。人基因工程糖链基序再用于连接治疗剂。

另外,本领域的技术人员将会了解偶联方法的多种可能变化形式。例如,糖链基序可用于连接聚乙二醇以延长完整抗体或抗原结合片段在血液、淋巴或其他细胞外液体内的半衰期。另外,通过将治疗剂连接到糖链基序和游离巯基上来构建“二价免疫偶联物”也是有可能的。这种游离巯基可位于抗体组分的铰链区。

#### 抗体融合蛋白

本发明涉及包含一种或多种抗体基序和另一种多肽如免疫调节剂或毒素基序的融合蛋白的应用。制备抗体融合蛋白的方法是本领域所熟知的。参见,例如,美国专利号6,306,393。包含IL-2基序的抗体融合蛋白可见于Boleti等, *Ann. Oncol.* 6:945(1995), Nicolet等, *Cancer Gene Ther.* 2:161(1995), Becker等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93:7826(1996), Hank等, *Clin. Cancer Res.* 2:1951(1996)以及Hu等, *Cancer Res.* 56:4998(1996)的描述。另外, Yang等, *Hum. Antibodies Hybridomas* 6:129(1995)描述了一种包含F(ab')<sub>2</sub>片段和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 基序的融合蛋白。

抗体-毒素融合蛋白的制备方法也是本领域技术人员所熟知的,其中的重组分子包含一种或多种抗体组分和毒素或化疗药物。Chaudhary等, *Nature* 339:394(1989), Brinkmann等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:8616(1991), Batra等, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:5867(1992), Friedman等, *J. Immunol.* 150:3054(1993), Wels等, *Int. J. Can.* 60:137(1995), Fominaya等, *J. Biol. Chem.* 271:10560(1996), Kuan等, *Biochemistry* 35:2872(1996)和 Schmidt等, *Int. J. Can.* 65:538(1996)描述了抗体-假单胞菌外毒素A融合蛋白。Kreitman等, *Leukemia* 7:553(1993), Nicholls等, *J. Biol. Chem.* 268:5302(1993), Thompson等, *J. Biol.*



Chem. 270:28037(1995)和 Vallera 等, Blood 88:2342(1996)描述了包含白喉毒素基序的抗体-毒素融合蛋白。Deonarain 等, Tumor Targeting 1:177(1995)描述了一种包含 RNA 酶基序的抗体-毒素融合蛋白, 而 Linardou 等, Cell Biophys. 24-25:243 (1994)制备了一种包含 DNA 酶 I 组分的抗体-毒素融合蛋白。白树毒素被用于 Wang 等, 《第 209 界 ACS 全国会议摘要》(Abstracts of the 209th ACS National Meeting), 加州阿纳海姆(Anaheim, Calif.), 1995 年 8 月 2-6 日, 第 1 部分, BIOT005 所描述的抗体-毒素融合蛋白中的毒素基序。作为另一个例子, Dohlsten 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:8945(1994)报道了一种包含葡萄球菌内毒素 A 的抗体-毒素融合蛋白。

适用于制备这种偶联物的毒素的例子有蓖麻毒素、相思豆毒素、核糖核酸酶、DNA 酶 I、葡萄球菌内毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白树毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素和假单胞菌内毒素。参见, 例如, Pastan 等, Cell 47:641 (1986)和 Goldenberg, CA-A Cancer Journal for Clinicians 44:43(1994)。其他合适的毒素是本领域技术人员所熟知的。

通过将抗体连接到可将前药(例如, 肽基化疗药物, 参见 WO81/01145)转化成活化抗癌药物的前药转化酶上, 本发明的抗体还可用于 ADEPT 中。参见, 例如, WO88/07378 和美国专利号 4,975,278。

可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括能以这种方式作用于前药以将其转化为其活性更高的细胞毒形式的酶。

可用于本发明方法中的酶包括而限于用于将含磷酸盐的前药转化成游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含硫酸盐的前药转化成游离药物的芳基硫酸酯酶; 用于将非毒性的 5-氟胞嘧啶转化成抗癌药物 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶; 用于将含肽前药转化为游离药物的蛋白酶如粘质沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L); 用于转化含 D 氨基酸取代的前药的 D-丙氨酰基羧肽酶; 用于将羰基化前药转化成游离药物的糖链裂解酶如 $\beta$ -半乳糖苷酶和神经氨酸苷酶; 用于将 $\beta$ -内酰胺衍生的药物转化成游离药物的 $\beta$ -内酰胺酶; 以及用于将药物转化成游离药物的青霉素酰胺酶如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶, 其中的药物是在其胺氮上分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的。另外, 具有酶活性的抗体, 在本领域中也被称

为抗体酶,可用于将本发明的前药转化成游离的活性药物(参见,例如, Massey, Nature 328:457-458(1987))。抗体-抗体酶偶联物可按照本文所述的方法制备,用于将抗体酶转运到肿瘤细胞群中。

本发明的酶可通过本领域熟知的技术共价结合到抗体上,例如使用上述异源双功能交联剂。利用本领域熟知的重组 DNA 技术可以构建包含本发明抗体的至少一个抗原结合区的融合蛋白,其中抗原结合区被连接到本发明的酶的至少一个功能活性部分上。(参见,例如, Neuberger 等, Nature 312:604-608(1984))。

### 非治疗性应用

本发明的抗体可用作靶抗原的亲纯化试剂,或者用于靶抗原的诊断试验,例如,检测特殊细胞、组织或血清中抗原的表达水平。抗体还可用于体内诊断试验。一般而言,用于此目的的抗体用放射性核素(如  $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$  或  $^{35}\text{S}$ )标记,这样可通过免疫液闪成像术来定位肿瘤。

本发明的抗体可用于任何已知的分析方法中,如竞争结合分析、直接和间接夹心分析如 ELISA 以及免疫沉淀分析。Zola,《单克隆抗体:技术操作手册》(Monoclonal Antibodies:A Manual of Techniques), 147-158 页(CRC 出版社 1987)。抗体还可用于免疫组化分析,用本领域熟知的方法标记肿瘤样品。

为了便于操作,本发明的抗体可以试剂盒的方式提供,即,预定量的试剂和诊断分析操作说明书的包装组合。如果抗体用酶标记,那么试剂盒将包含酶所需要的底物和辅因子(例如,可提供可检测发色基团或荧光基团的底物前体)。另外,其他附加物也可以包括在内,例如,稳定剂、缓冲液(例如,封闭缓冲液或裂解缓冲液)等。各种试剂的相对量可以变化很大,只要试剂溶液的浓度可以使分析的敏感性达到最佳就可以。优选的是试剂以干粉的形式提供,通常是冷冻干燥的,其中包括溶解时能提供具有合适浓度的试剂溶液的赋形剂。

## 实施例

本发明通过下面的实施例来说明,这些实施例并不意味着以任何方式限定本发明。

### 实施例 1

#### EPHB3 胞外结构域(ECD)的制备

在 EphB3 的 ECD 的重组表达中,在准备掺入表达载体时首先采用巢式 PCR 法掺入标签并工程改造编码区的末端。所用引物如下(均记为 5'-3'序列):

正向#1:

TCGTATACATTTCTTACATCTATGCGCTGGAAGAGACCCTCATGGA  
CACAAA (SEQ ID NO: 422)

正向#2:

GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACAT  
ATGAAATTCTT  
AGTCAACGTTGCCCTTGTTTTTATGGTCGTATACATTTCTTACATCTATGC  
G (SEQ ID NO: 423)

反向#1:

CGGGTCGTCGAGGTCCTCGTCGAAGGGCCTCGTGTAGTGGTAGTGG  
TAGTGCCT (SEQ ID NO: 424)

反向#2:

CCTCGTGTAGTGGTAGTGGTAGTGCCTCGAATTTGGGTCGAAAGAA  
CATGTTTCACC AGGG (SEQ ID NO: 425)

PCR 扩增用 PfuUltra™ Hotstart PCR Master Mix(PfuUltra™ 热启动 PCR 主混合物)(斯图特基因公司(Stratagene))按照厂家推荐的方法进行。用于扩增的模板是克隆到 pDONOR201 内的 EphB3 ECD 片段(数据未显示)。利用拓扑异构酶克隆方案将 ECD PCR 产物克隆到 pBlueBac4.5GW 中。通过双链测序验证最后选择的克隆。制备 10-20 µg 代表各克隆的 DNA 用于昆虫转染。

如下所述在孔虫细胞中利用该重组构建物表达 EphB3 ECD。对编码 EphB3 胞外结构域的质粒 DNA 和 Sapphire™ 基因组苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)DNA 的共同转染物进行噬斑纯化,以分离杆状病毒。扩增重组病毒并用于感染 Tn5 昆虫细胞,密度为  $1 \times 10^6$ - $1.5 \times 10^6$  细胞/毫升,在 10 L(工作体积)波浪式生物反应器内 moi 为 2-10。感染 48 小时后,收获细胞和上清,离心,对得到的上清进行浓缩。上清在 0.45 µm 中空纤维柱上澄清,然后用正切流 10kDa MW 截止膜进行 8 倍浓缩。在进行蛋白纯化前上清用 1L、0.2 µm 孔径的真空瓶过滤除菌。

如下所述纯化 EphB3 ECD。含有 EphB3 ECD 的昆虫细胞培养上清液以 13 毫升/分钟的流速通过用缓冲液 A(PBS/0.35M NaCl/5mM 咪唑)平衡的 25mL 镍螯合柱(G.E.树脂, 目录号 17-5318-03)。用 30 倍柱体积的缓冲液 A 至缓冲液 B(PBS/0.35M NaCl/250 mM 咪唑)的梯度洗脱含有 EphB3 ECD 的结合的蛋白质。用 SDS-PAGE 检测组分, 合并所需纯度的含 EphB3 ECD 组分。用缓冲液 A 透析该集合组分, 通过 2x5mL HisTrap (G.E.)柱。以与第一镍螯合柱相同的方式洗脱该 HisTrap 柱。用 SDS-PAGE 检测组分, 合并所需纯度的含 EphB3 ECD 蛋白的组分。用 PBS/0.1M 精氨酸透析最终集合组分。用 N 末端测序以及还原和非还原(考马斯蓝染色和 Western 分析)分析最终物质的种类和纯度。

## 实施例 2

### 鼠杂交瘤分泌的靶点特异性抗体的鉴定

用于产生杂交瘤的免疫原是人 EphB3 胞外结构域(ECD)的重组形式(对应于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 37-558),它是用杆状病毒/昆虫细胞表达系统产生的。在免疫中, ECD 与等体积的佐剂混合, 将该混合物皮下注射到后肢足垫的腹侧表面。按照不同的免疫方案, 每 3-14 天给小鼠注射免疫原, 以产生强烈免疫应答。然后, 处死出现良好免疫应答的小鼠, 收集淋巴结, 采集淋巴结 B 细胞。然后, 按照本领域熟知方法将该 B 细胞与骨髓瘤细胞融合产生杂交瘤, 用 ELISA 和 FACS 实验筛选杂交瘤中产生识别 EphB3 蛋白的抗体的杂交瘤。

## 实施例 3

### 通过噬菌体展示鉴定靶点特异性抗体

#### 筛选抗体.

为了分离一组具有激动性活性的抗-EphB3 抗体, 筛选 EphB3 胞外结构域(ECD)超免疫小鼠产生的全克隆(Omnichlonal)噬菌体展示文库(Buechler 等, 专利号 6057098)。

利用 ELISA 实验, 根据结合活性筛选按照美国专利号 6,057,098 的方法由全克隆文库获得的单个菌落。简要说, 将微量培养物培养至  $OD_{600}=0.6$ , 此时加入 0.2% w/v 阿拉伯糖、并于 30°C 振荡培养箱中培养过夜以诱导可溶性抗体

片段的表达。离心细菌，制备周质提取物，并按照微孔板生产商提供的标准 ELISA 实验方案检测与固定在 Nunc MaxiSorp™微孔板上的 EphB3-ECD 的抗体结合活性。也利用荧光活化的细胞分选(FACS)分析测定与 CHO-K1-EphB3 表达细胞的结合，从而评估抗体结合。

#### 将噬菌体展示鉴定的候选抗体转化为完整 IgG

为了将初始筛选中的先导候选结合物转变为含有抗体重链和轻链恒定区的抗体，将该结合物的重链和轻链可变区的编码序列克隆到享有专利权的编码  $\kappa$  和  $\gamma$ -1 恒定区基因的哺乳动物表达载体(WO 2004/033693)中。

在 293E 细胞中瞬时表达抗体，如 Handa 等所述(2004 年美国癌症生物学协会会议海报#1937)。在培养的第 6 天收获转染细胞的上清液，按照生产商实验方案用蛋白 A 琼脂糖(GE 健康护理公司(GE Healthcare))纯化 IgG。

### 实施例 4

#### 所选抗-EPHB3 抗体的亲和力测定

##### 方案 1:

通过胺偶联将蛋白 A 固定在 CM5 生物传感器芯片上。用 HBS-EP 缓冲液 (0.1M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005%表面活性剂 P20) 1:100 稀释 0.75 $\mu$ g/ml 抗-EphB3 抗体，用 1.5 分钟捕获到改良的生物传感器表面上。使 HBS-EP 缓冲液配制的不同浓度的重组可溶性 EphB3 ECD (胞外结构域)流过生物传感器表面。利用 Scrubber 和 BiaEvaluation 软件的组合，以 1:1 相互作用模型/全局拟合测定动力学和亲和力常数。

##### 方案 2:

通过胺偶联将大鼠抗-小鼠 Fc(RamFc)固定在 CM5 生物传感器芯片上。用 HBS-EP 缓冲液 1:200 稀释 0.75 $\mu$ g/ml 的抗-EphB3 抗体，用 1.5 分钟捕获到改良的生物传感器表面上。使 HBS-EP 缓冲液配制的不同浓度的重组可溶性 EphB3 ECD 流过生物传感器表面。利用 Scrubber 和 BiaEvaluation 软件的组合，以 1:1 相互作用模型/全局拟合测定动力学和亲和力常数。

亲和力实验的结果见下表 3。

表 3:

抗体	$K_a(M^{-1} \text{秒}^{-1})$	$K_d(\text{秒}^{-1})$	$K_D(\text{nM})$
XHA.05.337	3.53e4	2.79e-3	79
XHA.05.228	2.15e4	4.52e-3	210
XHA.05.200	4.86e4	1.39e-3	28.6
XHA.05.111*	2.14e5	1.21e-2	57
XHA.05.885*	1.39e5	1.19e-3	8.5
XPA.04.001	2.15e5	3.19e-4	1.5
XPA.04.019	1.18e5	7.20e-4	6.1
XPA.04.013	1.16e5	3.88e-4	3.4
XPA.04.018	1.49e5	2.34e-4	1.6
XPA.04.048	2.66e5	1.60e-4	0.6

\*用 RamFc 形式分析 XHA.05.111 和 XHA.05.885。

### 实施例 5

#### EPHB3 抗体表位分组

通过一系列竞争实验方案, 利用表面等离子共振(SPR)技术将抗-EphB3 抗体指定为(不同)表位组(bin)。在这种方法中, 直接或通过捕获剂将一种抗体固定在传感器芯片上, 注射的配体(EphB3 ECD)通过固定的抗体时抗体与配体结合。接着注射第二种测试抗体, 并测定它结合第一种抗体所捕获配体的能力。如果该抗体结合于配体上空间分离的表位, 那么第二种抗体也应能够结合配体/第一种抗体的复合物。

两种不同抗体同时结合同一配体分子的能力称为配对。

1. 第一系列的实验利用 CM5 传感器芯片, 所有流动室上包被有高密度的兔抗-小鼠 Fc 特异性抗体(RAM-Fc)。

a. 运行缓冲液为 HBS-EP (必爱可公司(Biacore®, Inc.)), 温度设定为 25°C, 流速为 10 微升/分钟。

b. 通过注射 1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  稀释液 1-3 分钟在各流动室上捕获不同抗体, 产生的捕获水平为 200-1000 RU。

c. 然后注射 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  小鼠 IgG 的 HBS-EP 溶液 30 分钟以封闭该表面。

d. 以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  注射准备测试配对的抗体, 以验证该芯片是否被有效封闭, 并测定该抗体的背景结合水平。

e. 以 2-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  注射配体 2-4 分钟。

f. 再次如上述步骤 1d 所述, 注射准备配对的抗体。如果抗体在此注射

期间结合，则两种抗体成对，因此将其归入不同的表位组。如果第二种抗体未能结合，则它与第一种抗体竞争结合，将其归入同一表位组或重叠表位组。

g. 作为自身配对的对照，测试各捕获抗体与自身的配对。

2. 一旦阐明了几个表位组或独特的非对抗体组后，则利用这些抗体进一步研究更多的抗体。每次使用四种抗体连续检测抗体。通过在四个流动室中分别捕获来自不同表位组的杂交瘤抗体，然后在所有四个流动室中同时进行上述配对实验，研究更大的样品组。

3. 也利用该过程评估人抗体 Fab 片段，改变是不使用以 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  小鼠 IgG 进行封闭的步骤，因为 RAM-Fc 表面不捕获人 Fab。

竞争实验的结果是，确定表 4 所示的表位组。结合亲和力最高的所有抗体(参见上述实施例 4)均属于第 3 组。

表 4: 获自 Biacore® 2000 配对数据的表位组。

第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组	第 6 组	第 7 组	第 8 组
XHA.05.465	XHA.05.119	XHA.05.964	XHA.05.660	XHA.05.676	XHA.05.030	XHA.05.200	XHA.05.111
XHA.05.783	XHA.05.228	XHA.05.653	XHA.05.552			XHA.05.005	
XHA.05.031	XHA.05.337	XHA.05.885	XHA.05.949			XHA.05.001	
XHA.05.942	XHA.05.440	XPA.04.001	XHA.05.151			XHA.05.888	
XHA.05.751	XPA.04.022	XPA.04.013	XPA.04.019				
XHA.05.599		XPA.04.018					
XPA.04.031		XPA.04.036					
XPA.04.030		XPA.04.046					
XPA.04.040		XPA.04.048					

## 实施例 6

### 利用基于流式细胞术的实验选择激动性 EPHB3 抗体并 检测 EPHB3 磷酸化和降解

为了鉴定靶向 EphB3 的激动性抗体，开发了两种基于流式细胞术(FACS)的实验来监测受体活化的下游影响：(1)总细胞磷酸化酪氨酸(pY)，作为信号传导途径激活的衡量；和(2)受体内化，以测定活化受体的下调。

#### 总细胞酪氨酸磷酸化

总细胞 pY 实验使用适应悬浮的、稳定转染的 CHO 细胞系，其高水平表达受体。利用该实验筛选杂交瘤上清液中纯化的杂交瘤衍生抗体和纯化的完整 IgG 重排的噬菌体展示衍生抗体。

将过度表达 EphB3 的适应悬浮的 CHO-K1 细胞接种于圆底 96 孔板中，密度为  $2 \times 10^5$  个细胞/孔。然后，将 EphB3 抗体 1:10 直接稀释到各样品孔中。37

℃培育样品 40-45 分钟。培育后，用 2%甲醛在室温下固定细胞 20 分钟。然后，用通透缓冲液洗涤细胞两次，重悬于含有 PE 偶联的小鼠抗磷酸化酪氨酸抗体 (PY20)的通透缓冲液。4℃培育细胞 1 小时，用通透缓冲液洗涤两次，用流式细胞术分析。

在 pY 实验中，约 24%受试抗体显示出激动性活性。然后，对抗体处理细胞(过度表达 EphB3 的 CHO 和肿瘤细胞系)的裂解物进行免疫沉淀和 Western 分析(见下)，数据证实，pY-诱导抗体引发 EphB3 的磷酸化。

#### 测定细胞表面上 EphB3 稳态水平的实验

对总细胞 pY 实验鉴定的优选候选物进行进一步鉴定，以确定细胞表面 EphB3 下调和降解。首先用 FACS 和 Biacore®进行表位竞争研究，以鉴定与优选 pY-诱导抗体竞争最少的强烈 FACS 阳性“检测”抗体。利用这些抗体开发基于 FACS 的实验，以监测加入 pY 诱导抗体 2 至 72 小时后的细胞表面 EphB3 水平。

用 10 µg/mL 抗 EphB3 抗体或重组配体蛋白培育适应悬浮的 SW620 细胞 2-72 小时。在各个时间点，利用杂交瘤产生的小鼠抗靶点检测抗体(用于嵌合人抗体处理的细胞)或嵌合的人抗靶点检测抗体(用于杂交瘤衍生抗体处理的细胞)，通过流式细胞术分析测定 EphB3 的细胞表面水平。虽然进行筛选以选择与处理抗体竞争结合 EphB3 最少的检测抗体，但在大部分情况下干扰水平很低(10-20%)。测定各处理抗体处理后，检测抗体结合的最大值，所用条件是用检测抗体染色前新鲜 SW620 细胞与处理抗体作短暂预孵育。

一小组抗体显示作用 2 小时后细胞表面受体明显下调，并持续维持 72 小时(参见例如，图 1)。

#### 用于检测靶点磷酸化的 IP-Western:

将表达 EphB3 的人细胞系培养至亚铺满(subconfluency)，在无血清培养基中培育 30 分钟，然后用不同浓度(0.2-10 µg/ml)配体或激动性抗体于 37℃处理 30 分钟。用 PBS 洗涤细胞，在蛋白酶抑制剂(罗氏完整小型无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物(Roche Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail)药片，按照生产商说明书使用)和磷酸酶抑制剂(西格玛(Sigma)磷酸酶抑制剂混合物 1 和 2，按照生产商推荐条件使用)存在下，用含 1% Triton X-100 和 0.1% SDS 的



Tris 缓冲盐水裂解。利用抗-EphB3 特异性抗体，从约 800  $\mu\text{g}$  澄清裂解物中免疫沉淀靶标，用 SDS-PAGE 分析，转移至硝基纤维素膜上，用抗磷酸化酪氨酸抗体(4G10, 昂斯特(Upstate))进行 Western 印迹分析。剥离该印迹，用抗-EphB3 特异性抗体再次检测，以测定蛋白质加样量。如图 2 所示，抗-EphB3 mAb 能引发 SW620 细胞中 EphB3 的磷酸化。如图 3 所示，低(0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )抗体浓度下，抗 EphB3 抗体诱导 EphB3 的磷酸化。

#### Western 印迹确认靶标的降解：

表达 EphB3 的人细胞系不进行处理，或者在完全培养基中用 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  配体或激动性 Ab 处理不同时间(2-72 小时)。在实验开始时给予配体或抗体一次。在所选时间点，用 PBS 洗涤细胞，在蛋白酶抑制剂(罗氏完整小型无 EDTA 蛋白酶抑制剂混合物药片，按照生产商说明书使用)和磷酸酶抑制剂(西格玛磷酸酶抑制剂混合物 1 和 2, 按照生产商推荐条件使用)存在下，用含 1% Triton X-100 和 0.1% SDS 的 Tris-缓冲盐水裂解。14,000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟澄清后，用 SDS-PAGE 分析 40  $\mu\text{g}$  裂解物，转移至硝基纤维素膜上，利用抗-EphB3 特异性抗体进行 Western 印迹分析。 $\beta$ -微管蛋白用作加样对照。通过增强的化学发光和放射自显影术检测靶标。如图 4 所示，除诱导 EphB3 内化外，抗-EphB3 mAb 还能诱导降解。如图 5 所示，一小组 mAb 能降低 EphB3 至少 72 小时。最后，如图 6 所示，多种细胞系通过磷酸化 EphB3 对激动性 mAb 作出应答。

根据上述实验，所选抗体的小结见下表 5：

表 5

抗体：	MFI：	总 pY(增加倍数)：	稳态 EphB3(%降低)	分组：
XPA.04.048	611	1.7	47.2	3
XPA.04.018	1610	1.7	46.4	3
XPA.04.01	1171	1.6	46.9	3
XPA.04.013	1283	1.6	49.8	3
XHA.05.337	559	2.8	71.7	2
XHA.05.200	942	1.5	70.4	7
XHA.05.111	1110	1.5	69.4	8
XHA.05.005	1280	1.6	67.1	7
XHA.05.228	666	3.3	66.8	2
XHA.05.030	500	2	52	6
XHA.05.964	800	1.5	48.6	3
XHA.05.885	1200	1.8	56.4	3

## 实施例 7

### 鼠抗体的人源化

本实施例展示了一种人源化鼠抗 EphB3 抗体的方法。

人源化 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048 轻链和重链基因的设计

鼠抗体 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018 和 XPA.04.048 的轻链和重链可变区氨基酸序列列于图 7。利用国家生物医药基础蛋白序列鉴定数据库或相似数据库鉴定的人抗体序列提供人源化抗体的框架。为了筛选人源化重链的序列，将小鼠重链序列与人抗体重链的序列进行比对。在每一个点上，人抗体的氨基酸都被选择为人源化序列所用的氨基酸，除非该位置属于以下四种情形之一，在这四种情况下选择小鼠的氨基酸：

(1) 该位置位于补体决定区(CDR)，如 Kabat, J. Immunol., 125, 961-969(1980)所定义的；

(2) 人抗体氨基酸在人重链的这个位置上是罕见的，而小鼠氨基酸在人重链的这个位置上是常见的；

(3) 该位置与小鼠重链氨基酸序列上的 CDR 非常接近；或者

(4) 小鼠抗体的三维模型显示该氨基酸在物理空间位置上靠近抗原结合区。

为了筛选人源化轻链的序列，将小鼠轻链序列与人抗体轻链的序列进行比对。在人源化序列的各个位置上选择人抗体氨基酸，除非该位置属于上述情形之一，这些情形重复如下：

(1) CDR；

(2) 小鼠氨基酸比人抗体氨基酸更常见；

(3) 靠近 CDR；或

(4) 在三维结构上可能靠近结合区。

实际使用的重链和轻链基因的核苷酸序列按如下步骤选择：

(1) 编码按照上述情形选择出的氨基酸序列的编码核苷酸序列；

(2) 这些编码序列的 5'端为编码前导(信号)序列的核苷酸序列。抗体一般

选择这些前导序列；

(3) 编码序列的 3'端为小鼠轻链 J5 区段和小鼠重链 J2 区段之后的核苷酸序列，这些都是小鼠序列的一部分。包含这些序列是因为它们包含剪接供者信号；以及

(4) 在序列的两端是 Xba I 位点，以便于在 Xba I 位点上切割并克隆到载体的 Xba I 位点内。

#### 人源化轻链和重链基因的构建

为了合成重链，利用应用生物系统公司(Applied Biosystems)的 380B DNA 合成仪合成 4 种寡核苷酸。两种寡核苷酸分别是重链的一条链的一部分，每条寡核苷酸都与下一条寡核苷酸重叠约 20 个核苷酸以便于退火。总之，寡核苷酸可覆盖整个人源化重链可变区，但两端多出若干核苷酸，这样便于在 Xba I 位点切割。寡核苷酸用聚丙烯酰胺凝胶纯化。

按照标准方法利用 ATP 和 T4 多核苷酸激酶磷酸化每一条寡核苷酸 (Maniatis 等, 《分子克隆: 实验室操作手册》, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 纽约冷泉港, (1989))。为了使磷酸化的寡核苷酸退火, 将寡核苷酸悬浮在 40  $\mu$ l TA(33 mM Tris 乙酸盐, pH 7.9, 66 mM 乙酸钾, 10 mM 乙酸镁)中, 每种寡核苷酸的浓度约为 3.75  $\mu$ M, 加热至 95°C 4 分钟, 然后缓慢冷却到 4°C。为了通过合成每一条寡核苷酸的相对链而从寡核苷酸合成完整基因, 加入下列组分, 总体积为 100  $\mu$ l:

10 $\mu$ l	退火的寡核苷酸
0.16 mM	每种脱氧核糖核苷酸
0.5 mM	ATP
0.5 mM	DTT
100 $\mu$ g/ml	BSA
3.5 $\mu$ g/ml	T4 g43 蛋白(DNA 聚合酶)
25 $\mu$ g/ml	T4 g44/62 蛋白(聚合酶辅助蛋白)
25 $\mu$ g/ml	45 蛋白(聚合酶辅助蛋白)

混合物在 37°C 孵育 30 分钟, 然后加入 10 u 的 T4 DNA 连接酶, 在 37°C 再孵育 30 分钟。通过在 70°C 孵育 15 分钟灭活聚合酶和连接酶。基因用 Xba I 消化, 在反应中加入 50  $\mu$ l 含 200  $\mu$ g/ml BSA、1 mM DTT、43  $\mu$ l 水和 5  $\mu$ l Xba I 的 2 $\times$ TA。反应在 37°C 孵育 3 小时, 然后在凝胶上纯化。从凝胶上纯化 Xba I 片段, 然后利用标准方法克隆到质粒 pUC19 的 Xba I 位点。利用标准技术纯化

质粒，通过双脱氧法测序。

表达人源化轻链和重链的质粒通过如下过程构建：从已插入重链和轻链 Xba I 片段的 pUC19 质粒中分离轻链和重链 Xba I 片段，然后将其插入到合适表达载体的 Xba I 位点，这种载体被转染到合适的宿主细胞内时可表达高水平的完整重链。

### 人源化抗体的合成和亲和力

表达载体转染到小鼠 Sp2/0 细胞内，根据表达载体赋予的可筛选标记物按照标准方法筛选整合了质粒的细胞。为了证明这些细胞能够分泌结合 EphB3 的抗体，细胞的上清与已知表达 EphB3 的细胞共孵育。洗涤以后，细胞用荧光素标记的羊抗人抗体标记，洗涤，并在 FACSCAN 细胞荧光测定仪上测定荧光强度。

在下一个实验中，将产生人源化抗体的细胞注射到小鼠中，收集得到的腹水。按照标准方法，通过 Affigel-10 支持物(加州里士满市的伯乐实验室公司(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.))上制备的山羊抗人免疫球蛋白抗体的亲和柱(马萨诸塞州利特尔顿的 PC 公司(Pro-Chem Inc., Littleton, MA)或类似装置)从腹水中纯化基本均一的人源化抗体。根据本领域熟知的技术确定人源化抗体相对于起始小鼠抗体的亲和力。

## 实施例 8

### 鼠抗体的人工程化

本实施例描述了人工程化<sup>TM</sup>抗体的克隆和表达以及这种抗体的纯化和结合亲和力测定。

### 人工程化<sup>TM</sup>序列的设计

抗体可变区的人工程化<sup>TM</sup>已由 Studnicka 描述[参见，例如，Studnicka 等，美国专利号 5,766,886；Studnicka 等，Protein Engineering 7:805-814(1994)]，这是一种用于降低抗体分子的免疫原性同时又能保持其结合活性的方法。根据该方法，氨基酸取代可分为风险不同的三组：(1)低风险改变是降低免疫原性的潜能最大而破坏抗原结合活性的可能最小的那些改变；(2)中等风险改变是虽然可被用于进一步降低免疫原性，但是有较大可能影响抗原结合或蛋白折叠的那些

氨基酸；(3)高风险残基是对于结合或维持抗体结构具有重要作用并且最可能影响抗原结合或蛋白折叠的那些残基。由于脯氨酸在维持三维结构中的作用，通常认为在脯氨酸上进行修饰至少是中等风险改变，即使该位置一般是低风险位置。优选取代型改变，但也可采用插入和缺失。图 7 显示 XPA.04.001、XPA.04.013、XPA.04.018、XPA.04.048 轻链和重链的各氨基酸残基的风险分配，分为高风险、中等风险或低风险改变。

采用这种方法将小鼠抗体的轻链和重链可变区人工程化<sup>TM</sup>。通过将小鼠可变区的氨基酸序列与人可变区序列进行比对可以鉴定出处于低风险位置并且能够用该方法进行修饰的候选氨基酸残基。所有人可变区都可以应用，其中包括独特的 VH 或 VL 序列、或者人共有 VH 或 VL 序列。低风险位置上任意数目的氨基酸，或者全部氨基酸残基都可以被改变。

同样，通过将小鼠可变区的氨基酸序列与人可变区序列进行比对可以鉴定出处于低风险和中等风险所有位置并且能够用该方法进行修饰的候选氨基酸残基。低风险或中等风险位置上任意数目的氨基酸，或者低风险和中等风险位置上的全部氨基酸残基都可以被改变。

#### 用于开发永久(Permanent)细胞系的表达载体的制备

用合成型核苷酸合成法构建编码上述各重链和轻链 V 区序列以及抗体衍生信号序列的 DNA 片段。将编码上述各轻链 V 区氨基酸序列的 DNA 插入含有人  $\kappa$  轻链恒定区的载体 pMXPIO 中。将编码上述各重链 V 区氨基酸序列的 DNA 插入含有人  $\gamma$ -1、2、3 或 4 重链恒定区的载体 pMXP6 中。所有这些载体均含有 hCMV 启动子和小鼠  $\kappa$  轻链 3'非翻译区，以及选择性标记基因，如用于选择 G418-或组氨醇-抗性转染子的 neo 或 his。

#### 用于瞬时表达的载体的制备

也可构建用于瞬时转染的含有上述轻链或重链基因的载体。这些载体类似于上述永久转染中所用的载体，但它们不含 neo 或 his 基因，而含有 EB 病毒 oriP，以便在表达 EB 病毒核抗原的 HEK293 细胞中复制。

在 HEK293E 细胞中瞬时表达人工程化抗-EphB3 抗体

将各自含有 EB 病毒的 oriP 和上述轻链或重链基因的载体单独瞬时转染到 HEK293E 细胞中。培育该瞬时转染细胞至多 10 天，然后回收上清液，用蛋白

A 层析纯化抗体。

#### 永久转染的 CHO-K1 细胞的培养

上述包含一个拷贝的轻链和重链基因的载体转染到 Ex-Cell 302 适应的 CHO-K1 细胞内。适应在 Ex-Cell 302 培养基内悬浮生长的 CHO-K1 细胞通常用 40  $\mu\text{g}$  线性载体电穿孔转染。或者，线性化 DNA 可与线性聚乙烯亚胺(PEI)复合并用于转染。细胞接种到包含 Ex-Cell 302 培养基的 96 孔板中，其中添加了 1% FBS 和 G418。筛选 96 孔板内的克隆，每次转染最多约有 10%的克隆被转移到 24 孔板中，培养基为 Ex-Cell 302 培养基。

繁殖力试验在 24 孔板内进行，用 Ex-Cell 302 培养基培养 7 天和 14 天，取此时的上清通过 IgG 的免疫球蛋白 ELISA 试验测定分泌的抗体水平。

将优选克隆转移到含 Ex-Cell 302 培养基的摇瓶内。细胞适应悬浮生长后，立即用 Ex-Cell 302 培养基内的这些克隆进行摇瓶试验。细胞在含 25 ml 培养基的 125 ml 锥形瓶中培养至多 10 天。在培养过程中，至少每隔一天打开摇瓶通气，在孵育结束时通过 IgG ELISA 测定培养基内的免疫球蛋白多肽的水平。用两种或三种多单位转录载体顺序转染同一细胞系可得到免疫球蛋白表达水平进一步升高的克隆和细胞系，优选表达水平升高到 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  或更高。

#### 纯化

从本发明的载体和所有细胞系来纯化免疫球蛋白多肽的方法已有报道。例如，根据本领域熟知的方法，培养终止后通过过滤去除细胞。滤液加载到蛋白 A 柱上(如果需要，可以反复过柱)。洗涤该柱，然后从该柱洗脱下来表达和分泌的免疫球蛋白多肽。为了制备抗体产物，将蛋白 A 集合置于低 pH(在 pH3 环境中处理 30 分钟到 1 小时)环境中作为病毒灭活步骤。然后通过吸附性阳离子交换步骤进一步纯化产物。从吸附性分离柱上洗脱下来的产物通过病毒阻留滤膜以进一步清除可能存在的病毒颗粒。过滤物通过阴离子交换柱进一步纯化，产物不与阴离子交换柱结合。最后，通过渗滤将产物转移到制剂缓冲液中结束纯化过程。将蛋白浓度调整到至少 1  $\text{mg}/\text{mL}$  并添加稳定剂。

#### 结合活性

评价重组人工程化<sup>TM</sup>抗体的 EphB3 结合活性。摇瓶培养物上清通过蛋白 A 柱以纯化蛋白，然后在  $A_{280}$  确定蛋白浓度。结合活性试验按照其他实施例描

述的方法进行。

## 实施例 9

### EPHB3-特异性抗体的体内效果

为了检测抗-EphB3 抗体在体内对肿瘤生长的作用，采用常位异种移植瘤模型，该模型是将乳腺癌细胞系如 MDA-MB-231 或 MDA-MB-435 植入雌性 SCID-米色鼠的乳房脂肪垫中或其附近的模型。将癌细胞(每只小鼠： $5 \times 10^6$  个细胞，50-100  $\mu$ l)与等体积的基质胶混合，直接注入手术切开的乳房脂肪垫中，或皮下注射到乳房脂肪垫上。将小鼠放回饲养笼，监测肿瘤生长，直到体积达到约 100-150  $\text{mm}^3$ 。然后，将小鼠随机分成治疗组。

治疗由每周腹膜内注射两次抗体或同种型对照抗体组成。功效研究中所用的剂量范围是 0.2-20 mg/kg。每周测量肿瘤体积 2-3 次，通过肿瘤体积降低百分数判断激动剂治疗小鼠与对照治疗小鼠中的功效。

上述所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请以及本说明书参考的和/或申请书数据表中所列的非专利出版物都已完整纳入作为参考。

从上文可以看出，虽然本文为了阐述本发明已经描述了本发明的特殊实施方式，但是只要不偏离本发明的精神和范围可以作出各种改变。

<110>	J. 许(Hsu)等					
<120>	EPHB3-特异性抗体和其应用					
<130>	PP028230.0002(27527/41965A)					
<150>	US 60/835,777					
<151>	2006-08-04					
<160>	425					
<170>	PatentIn 3.4版					
<210>	1					
<211>	4234					
<212>	DNA					
<213>	智人(Homo sapiens)					
<400>	1					
cgtgagcggc	gcagcaagat	cccagctcgg	accccgagc	gcgcgcgccc	ccgaagcccc	60
ggatcccagt	cgggcccga	gctgaccgcc	agattactgt	gcatcccga	tcacgaccac	120
ctgcacccctc	ctgcccggc	cegccccca	agtcctcagg	cacccagctc	cccggcgccc	180
cggatcctcc	tggaccggtc	cgtccagatt	cccgcgggac	cgacctgtcc	gcatccccag	240
gaccgccggg	ctcgggtgcac	cgcctcggtc	ccggagccgc	ccgcctggat	tgcatccct	300
cctctcctgg	atctcctggg	acccgacgcg	agcctgcccc	ggagcccgcc	gagcgcaccc	360
tctctcgggt	gcctgcagcc	cegcggcg	ggcccggccc	ggcgcggccc	ggctcggctc	420
ctagagctgc	cacggccatg	gccagagccc	gcccgcgccc	gcccgcctcg	ccgccgccgg	480
ggctttctgc	gctgctccct	cegcctgctc	tgctgcccgt	gctgctgctg	cccgcggct	540
gccgggctg	ggaagagacc	ctcatggaca	caaaatgggt	aacatctgag	ttggcgtgga	600
catctcatcc	agaaagtggg	tgggaagagg	tgagtggcta	cgatgaggcc	atgaatccca	660
tccgcacata	ccaggtgtgt	aatgtgcgcg	agtcaagcca	gaacaactgg	cttcgcacgg	720
ggttcatctg	gcggcgggat	gtgcagcggg	tctacgtgga	gctcaagttc	actgtgcgtg	780
actgcaacag	catcccac	atcccggct	cctgcaagga	gacctcaac	ctcttctact	840
acgaggetga	cagcagatgt	gcctcagcct	cctccccctt	ctggatggag	aaccctacg	900
tgaaagtgga	caccattgca	cccgatgaga	gcttctcgcg	gctggatgcc	ggccgtgtca	960
acaccaaggt	gpcagcttt	gggccaactt	ccaaggctgg	cttctacctg	gccttccagg	1020
accaggccgc	ctgcatgtcg	ctcatctccg	tgcgcgcctt	ctacaagaag	tgtgatcca	1080
ccaccgacg	cttcgcactc	ttccccgaga	ccctcactgg	ggcggagccc	acctcgtctg	1140
tcattgtctc	tgccaactgc	ccgtgagagg	ccgtggagg	gtcggtgcca	ctcaagctct	1200
actgcaacgg	cgatggggag	tggatgggtc	ctgtgggtgc	ctgcaactgt	gccaccggcc	1260
atgagccagc	tgccaaggag	tcccagtgcc	gcccctgtcc	ccctgggagc	tacaaggcga	1320
agcagggaga	ggggccctgc	ctcccagtc	cccccaacag	ccgtaccacc	tcccagccg	1380
ccagcatctg	cacctgccac	aataacttct	accgtgcaga	ctcggactct	gcgacagtg	1440
cctgtaccac	cgtgccatct	ccaccocgag	gtgtgatctc	caatgtgaat	gaaacctcac	1500
tgatcctcga	gtggagttag	ccccgggacc	tgggtggccg	ggatgacctc	ctgtacaatg	1560
tcatctgcaa	gaagtgccat	ggggctggag	gggcctcagc	ctgctcacgc	tgtgatgaca	1620
acgtggagtt	tgtgctcctg	cagctgggcc	tgacggagcg	ccgggtccac	atcagccatc	1680
tgtcggccca	cacgcgctac	acctttgagg	tgcaggcgg	caacgggtgc	tgggcaaga	1740
gcctctctgc	gcctcgttat	gcgccgtga	atataccac	aaaccaggct	gccccgtctg	1800
aagtgccac	actacgcctg	cacagcagct	caggcagcag	cctcacccta	tcctgggcac	1860
cccagagc	gcccacgga	gtcatctgg	actacgagat	gaagtacttt	gagaagagcg	1920
agggcatcgc	ctccacagtg	accagccaga	tgaactccgt	gcagctggac	gggcttcggc	1980
ctgacgccg	ctatgtggtc	caggtccgtg	ccgcacag	agctggctat	gggcagtaca	2040
gccgccctgc	cgagtttgag	accacaagtg	agagaggctc	tggggcccag	cagctccagg	2100
agcagcttcc	cctcatcgtg	ggctccgcta	cagctgggct	tgtcttcgtg	gtggtctctg	2160
tggatcatgc	tatcgtctgc	ctcaggaagc	agcgacacgg	ctctgattcg	gagtacacgg	2220
agaagctgca	gcagtacatt	gctcctggaa	tgaaggttta	tattgacctt	tttacctacg	2280
aggaccctaa	tgaggctgtt	cgggagtttg	ccaaggagat	cgactgttcc	tgcgtcaaga	2340
tcgaggaggt	gatcggagct	ggggaatttg	gggaagtgtg	ccgtggctga	ctgaaacagc	2400
ctggccgccc	agaggtgttt	gtggccatca	agacgtgaa	ggtgggctac	accgagagggc	2460
agcggcggga	cttccctaagc	gaggcctcca	tcatgggtca	gtttgatcac	cccaatataa	2520
tccggctcga	gggcgtggtc	accaaaagtc	ggccagttat	gatcctcact	gagttcatgg	2580
aaaactgcgc	cctggactcc	ttcctccggc	tcaacgatgg	gcagttcacg	gtcatccagc	2640
tgggtggcat	gttgcggggc	attgctgccg	gcataagta	cctgtccgag	atgaactatg	2700
tgcaccgcga	cctggctgct	cgcaacatcc	ttgtcaacag	caacctggct	tgcaaagtct	2760
cagacttttg	cctctcccgc	ttcctggagg	atgacccctc	cgatcctacc	tacaccagtt	2820
ccctgggcgg	gaagatcccc	atccgctgga	ctgccccaga	ggccatagcc	tatcggaggt	2880
tcacttctgc	tagtgatgct	tggagctacg	gaattgtcat	gtgggaggtc	atgagctatg	2940



```

gagagcgacc ctactgggac atgagcaacc aggatgtcat caatgccgtg gagcaggatt 3000
accggctgcc accacccatg gactgtccca cagcactgca ccagctcatg ctggactgtc 3060
gggtgcggga ccggaacctc aggcccaaat tctccagat tgtcaatacc ctggacaagc 3120
tcacccgcaa tgctgccagc ctcaaggtea ttgccagcgc tcagtctggc atgtcacagc 3180
ccctcctgga ccgcacggtc ccagattaca caaccttcac gacagttggg gattggctgg 3240
atgccatcaa gatggggcgg tacaaggaga gcttcgtcag tgcggggttt gcatectttg 3300
acctgggtgc ccagatgacg gcagaagacc tgcctcgtat tggggtcacc ctggccggcc 3360
accagaagaa gatcctgagc agtatccagg acatgcggct gcagatgaac cagacgctgc 3420
ctgtgcaggt ctgacaccgg ctcccacggg gacctgagg accgtgcagg gatgccaagc 3480
agccggctgg actttcggac tcttggactt ttggatgect ggccttaggc tgtggcccag 3540
aagctggaag tttgggaaag gcccaagctg ggacttctcc aggctctgtg tccctcccca 3600
ggaagtgcgc cccaaacctc ttcataattga agatggatta ggagaggggg tgatgacccc 3660
tcccgaagcc cctcaggccc cagacctcc tgcctccag caggggatcc ccacaacctc 3720
acacttgtct gttcttcagt ctggaggctc ctggcagggt caggctgggg taagccgggg 3780
ttccacaggg cccagccctg gcaggggtct ggccccccag gtagcgggag agcagtcctt 3840
ccctcaggaa ctggaggagg ggactccagg aatggggaaa tgtgacacca ccatcctgaa 3900
gccagcttgc acctccagtt tgcacaggga tttgttctgg gggctgaggg ccctgtcccc 3960
acccccgcc ttgggtctgt cataaaaggg caggcagggg caggctgagg agttgccctt 4020
tgccccccag agactgactc tcagagccag agatgggatg tgtgagtgtg tgtgtgtgtg 4080
tgtgtgtgtg cgcgcgcgcg cgcgtgtgtg tgtgcacgca ctggcctgca cagagagcat 4140
gggtgagcgt gtaaaagctt ggccctgtgc cctacaatgg ggccagctgg gccgacagca 4200
gaataaaggc aataagatga aaaaaaaaaa aaaa 4234

```

<210> 2

<211> 998

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Ala Arg Ala Arg Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro Gly Leu  
1 5 10 15

Leu Pro Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro  
20 25 30

Ala Gly Cys Arg Ala Leu Glu Glu Thr Leu Met Asp Thr Lys Trp Val  
35 40 45

Thr Ser Glu Leu Ala Trp Thr Ser His Pro Glu Ser Gly Trp Glu Glu  
50 55 60

Val Ser Gly Tyr Asp Glu Ala Met Asn Pro Ile Arg Thr Tyr Gln Val  
65 70 75 80

Cys Asn Val Arg Glu Ser Ser Gln Asn Asn Trp Leu Arg Thr Gly Phe  
85 90 95

Ile Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr  
100 105 110

Val Arg Asp Cys Asn Ser Ile Pro Asn Ile Pro Gly Ser Cys Lys Glu  
115 120 125

Thr Phe Asn Leu Phe Tyr Tyr Glu Ala Asp Ser Asp Val Ala Ser Ala  
130 135 140

Ser Ser Pro Phe Trp Met Glu Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile  
145 150 155 160

Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr  
165 170 175

Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala  
180 185 190

Phe Gln Asp Gln Gly Ala Cys Met Ser Leu Ile Ser Val Arg Ala Phe  
195 200 205

Tyr Lys Lys Cys Ala Ser Thr Thr Ala Gly Phe Ala Leu Phe Pro Glu  
210 215 220

Thr Leu Thr Gly Ala Glu Pro Thr Ser Leu Val Ile Ala Pro Gly Thr  
 225 230 235 240  
 Cys Ile Pro Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys  
 245 250 255  
 Asn Gly Asp Gly Glu Trp Met Val Pro Val Gly Ala Cys Thr Cys Ala  
 260 265 270  
 Thr Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro  
 275 280 285  
 Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu Gly Pro Cys Leu Pro Cys  
 290 295 300  
 Pro Pro Asn Ser Arg Thr Thr Ser Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys  
 305 310 315 320  
 His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys  
 325 330 335  
 Thr Thr Val Pro Ser Pro Pro Arg Gly Val Ile Ser Asn Val Asn Glu  
 340 345 350  
 Thr Ser Leu Ile Leu Glu Trp Ser Glu Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg  
 355 360 365  
 Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala Gly  
 370 375 380  
 Gly Ala Ser Ala Cys Ser Arg Cys Asp Asp Asn Val Glu Phe Val Pro  
 385 390 395 400  
 Arg Gln Leu Gly Leu Thr Glu Arg Arg Val His Ile Ser His Leu Leu  
 405 410 415  
 Ala His Thr Arg Tyr Thr Phe Glu Val Gln Ala Val Asn Gly Val Ser  
 420 425 430  
 Gly Lys Ser Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr  
 435 440 445  
 Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser  
 450 455 460  
 Ser Gly Ser Ser Leu Thr Leu Ser Trp Ala Pro Pro Glu Arg Pro Asn  
 465 470 475 480  
 Gly Val Ile Leu Asp Tyr Glu Met Lys Tyr Phe Glu Lys Ser Glu Gly  
 485 490 495  
 Ile Ala Ser Thr Val Thr Ser Gln Met Asn Ser Val Gln Leu Asp Gly  
 500 505 510  
 Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val  
 515 520 525  
 Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Ser Arg Pro Ala Glu Phe Glu Thr Thr Ser  
 530 535 540  
 Glu Arg Gly Ser Gly Ala Gln Gln Leu Gln Glu Gln Leu Pro Leu Ile  
 545 550 555 560  
 Val Gly Ser Ala Thr Ala Gly Leu Val Phe Val Val Ala Val Val Val  
 565 570 575  
 Ile Ala Ile Val Cys Leu Arg Lys Gln Arg His Gly Ser Asp Ser Glu  
 580 585 590

Tyr Thr Glu Lys Leu Gln Gln Tyr Ile Ala Pro Gly Met Lys Val Tyr  
 595 600 605  
 Ile Asp Pro Phe Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Glu Ala Val Arg Glu Phe  
 610 615 620  
 Ala Lys Glu Ile Asp Val Ser Cys Val Lys Ile Glu Glu Val Ile Gly  
 625 630 635 640  
 Ala Gly Glu Phe Gly Glu Val Cys Arg Gly Arg Leu Lys Gln Pro Gly  
 645 650 655  
 Arg Arg Glu Val Phe Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Val Gly Tyr Thr  
 660 665 670  
 Glu Arg Gln Arg Arg Asp Phe Leu Ser Glu Ala Ser Ile Met Gly Gln  
 675 680 685  
 Phe Asp His Pro Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Val Thr Lys Ser  
 690 695 700  
 Arg Pro Val Met Ile Leu Thr Glu Phe Met Glu Asn Cys Ala Leu Asp  
 705 710 715 720  
 Ser Phe Leu Arg Leu Asn Asp Gly Gln Phe Thr Val Ile Gln Leu Val  
 725 730 735  
 Gly Met Leu Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr Leu Ser Glu Met  
 740 745 750  
 Asn Tyr Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser  
 755 760 765  
 Asn Leu Val Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Phe Leu Glu  
 770 775 780  
 Asp Asp Pro Ser Asp Pro Thr Tyr Thr Ser Ser Leu Gly Gly Lys Ile  
 785 790 795 800  
 Pro Ile Arg Trp Thr Ala Pro Glu Ala Ile Ala Tyr Arg Lys Phe Thr  
 805 810 815  
 Ser Ala Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met  
 820 825 830  
 Ser Tyr Gly Glu Arg Pro Tyr Trp Asp Met Ser Asn Gln Asp Val Ile  
 835 840 845  
 Asn Ala Val Glu Gln Asp Tyr Arg Leu Pro Pro Pro Met Asp Cys Pro  
 850 855 860  
 Thr Ala Leu His Gln Leu Met Leu Asp Cys Trp Val Arg Asp Arg Asn  
 865 870 875 880  
 Leu Arg Pro Lys Phe Ser Gln Ile Val Asn Thr Leu Asp Lys Leu Ile  
 885 890 895  
 Arg Asn Ala Ala Ser Leu Lys Val Ile Ala Ser Ala Gln Ser Gly Met  
 900 905 910  
 Ser Gln Pro Leu Leu Asp Arg Thr Val Pro Asp Tyr Thr Thr Phe Thr  
 915 920 925  
 Thr Val Gly Asp Trp Leu Asp Ala Ile Lys Met Gly Arg Tyr Lys Glu  
 930 935 940  
 Ser Phe Val Ser Ala Gly Phe Ala Ser Phe Asp Leu Val Ala Gln Met  
 945 950 955 960  
 Thr Ala Glu Asp Leu Leu Arg Ile Gly Val Thr Leu Ala Gly His Gln

965 970 975  
 Lys Lys Ile Leu Ser Ser Ile Gln Asp Met Arg Leu Gln Met Asn Gln  
 980 985 990

Thr Leu Pro Val Gln Val  
 995

<210> 3  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 3  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 4  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 4  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110

Ser

<210> 5  
 <211> 113

<212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 5  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 6  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 6  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Asp Leu Val Met Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Gln Ile Asp Pro Ser Asp Ser Ser Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Phe  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Ser Ser Thr Gly Pro Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100 105 110

Ser Ser

<210> 7  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 7  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Val Ser Ile Pro Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Gly Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His  
 85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 8  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 8  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Ile Ser Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110

Ser

<210> 9  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 9  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Leu Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His

85 90 95  
 Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 10  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 10  
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
 20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Arg Gly Ile Thr Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110

Ser

<210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 11  
 Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val  
 1 5

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12  
 Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 13  
 Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val  
 1 5

<210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

---

<400> 14  
Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu  
1 5

<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 15  
Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu  
1 5

<210> 16  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 16  
Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys  
1 5

<210> 17  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 17  
Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe  
1 5

<210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 18  
Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr  
1 5

<210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 19  
Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val  
1 5

<210> 20  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 20  
Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg  
1 5

<210> 21  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 21  
Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp  
1 5

<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT



---

<213> 智人(Homo sapiens)  
<400> 22  
Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr  
1 5

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 23  
Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 24  
Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 25  
Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu  
1 5

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 26  
Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys  
1 5

<210> 27  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 27  
Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe  
1 5

<210> 28  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 28  
Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr  
1 5

<210> 29  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 29  
Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val  
1 5

<210> 30

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 30  
 Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg  
 1 5

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 31  
 Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp  
 1 5

<210> 32  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 32  
 Trp Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val  
 1 5 10

<210> 33  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 33  
 Arg Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 34  
 Arg Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 35  
 Asp Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys  
 1 5 10

<210> 36  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 36  
 Val Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe  
 1 5 10

<210> 37  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 37  
 Gln Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr  
 1 5 10

---

<210> 38  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 38  
 Arg Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 39  
 Val Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg  
 1 5 10

<210> 40  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 40  
 Tyr Val Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 41  
 Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr  
 1 5

<210> 42  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 42  
 Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile  
 1 5

<210> 43  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 43  
 Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala  
 1 5

<210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 44  
 Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro  
 1 5

<210> 45  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 45

Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp  
1 5

<210> 46  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 46  
Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu  
1 5

<210> 47  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 47  
Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser  
1 5

<210> 48  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 48  
Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe  
1 5

<210> 49  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 49  
Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser  
1 5

<210> 50  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 50  
Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg  
1 5

<210> 51  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 51  
Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu  
1 5

<210> 52  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 52  
Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp  
1 5

<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 53  
Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala  
1 5

<210> 54  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 54  
Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly  
1 5

<210> 55  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 55  
Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg  
1 5

<210> 56  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 56  
Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val  
1 5

<210> 57  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 57  
Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn  
1 5

<210> 58  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 58  
Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr  
1 5

<210> 59  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 59  
Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys  
1 5

<210> 60  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 60  
Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val  
1 5

<210> 61  
<211> 8

---

<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 61  
Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg  
1 5

<210> 62  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 62  
Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser  
1 5

<210> 63  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 63  
Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe  
1 5

<210> 64  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 64  
Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly  
1 5

<210> 65  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 65  
Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro  
1 5

<210> 66  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 66  
Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu  
1 5

<210> 67  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 67  
Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser  
1 5

<210> 68  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 68  
Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys  
1 5

---

<210> 69  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 69  
Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala  
1 5

<210> 70  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 70  
Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly  
1 5

<210> 71  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 71  
Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe  
1 5

<210> 72  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 72  
Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr  
1 5

<210> 73  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 73  
Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu  
1 5

<210> 74  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 74  
Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala  
1 5

<210> 75  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 75  
Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe  
1 5

<210> 76  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 76  
Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln

---

1                    5

<210> 77  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 77  
 Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile  
 1                    5

<210> 78  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 78  
 Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala  
 1                    5

<210> 79  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 79  
 Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro  
 1                    5

<210> 80  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 80  
 Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp  
 1                    5

<210> 81  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 81  
 Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu  
 1                    5

<210> 82  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 82  
 Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser  
 1                    5

<210> 83  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 83  
 Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe  
 1                    5

<210> 84  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)



---

<400> 84  
Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser  
1 5

<210> 85  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 85  
Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg  
1 5

<210> 86  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 86  
Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu  
1 5

<210> 87  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 87  
Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp  
1 5

<210> 88  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 88  
Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala  
1 5

<210> 89  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 89  
Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly  
1 5

<210> 90  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 90  
Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg  
1 5

<210> 91  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 91  
Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val  
1 5

<210> 92  
<211> 9  
<212> PRT

---

<213> 智人(Homo sapiens)  
<400> 92  
Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn  
1 5

<210> 93  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 93  
Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr  
1 5

<210> 94  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 94  
Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys  
1 5

<210> 95  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 95  
Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val  
1 5

<210> 96  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 96  
Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg  
1 5

<210> 97  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 97  
Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser  
1 5

<210> 98  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 98  
Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe  
1 5

<210> 99  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 99  
Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly  
1 5

<210> 100

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 100  
 Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro  
 1 5

<210> 101  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 101  
 Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu  
 1 5

<210> 102  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 102  
 Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser  
 1 5

<210> 103  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 103  
 Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys  
 1 5

<210> 104  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 104  
 Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala  
 1 5

<210> 105  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 105  
 Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly  
 1 5

<210> 106  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 106  
 Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe  
 1 5

<210> 107  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 107  
 Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr  
 1 5

---

<210> 108  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 108  
Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu  
1 5

<210> 109  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 109  
Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala  
1 5

<210> 110  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 110  
Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe  
1 5

<210> 111  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 111  
Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln  
1 5

<210> 112  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 112  
Asn Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala  
1 5 10

<210> 113  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 113  
Pro Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro  
1 5 10

<210> 114  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 114  
Tyr Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp  
1 5 10

<210> 115  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 115

---

Val Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu  
1 5 10

<210> 116  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 116  
Lys Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser  
1 5 10

<210> 117  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 117  
Val Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe  
1 5 10

<210> 118  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 118  
Asp Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser  
1 5 10

<210> 119  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 119  
Thr Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg  
1 5 10

<210> 120  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 120  
Ile Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu  
1 5 10

<210> 121  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 121  
Ala Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp  
1 5 10

<210> 122  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 122  
Pro Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala  
1 5 10

<210> 123  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 123  
Asp Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly  
1 5 10

<210> 124  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 124  
Glu Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg  
1 5 10

<210> 125  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 125  
Ser Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val  
1 5 10

<210> 126  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 126  
Phe Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn  
1 5 10

<210> 127  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 127  
Ser Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr  
1 5 10

<210> 128  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 128  
Arg Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys  
1 5 10

<210> 129  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 129  
Leu Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val  
1 5 10

<210> 130  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 130  
Asp Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg  
1 5 10

<210> 131  
<211> 10

<212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 131  
 Ala Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser  
 1 5 10

<210> 132  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 132  
 Gly Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe  
 1 5 10

<210> 133  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 133  
 Arg Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly  
 1 5 10

<210> 134  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 134  
 Val Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro  
 1 5 10

<210> 135  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 135  
 Asn Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu  
 1 5 10

<210> 136  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 136  
 Thr Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser  
 1 5 10

<210> 137  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 137  
 Lys Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys  
 1 5 10

<210> 138  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 138  
 Val Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala  
 1 5 10

---

<210> 139  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 139  
 Arg Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly  
 1 5 10

<210> 140  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 140  
 Ser Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe  
 1 5 10

<210> 141  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 141  
 Phe Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr  
 1 5 10

<210> 142  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 142  
 Gly Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu  
 1 5 10

<210> 143  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 143  
 Pro Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 144  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 144  
 Leu Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe  
 1 5 10

<210> 145  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 145  
 Ser Lys Ala Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln  
 1 5 10

<210> 146  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 146  
 Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro



---

1                    5

<210> 147  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 147  
 Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu  
 1                    5

<210> 148  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 148  
 Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys  
 1                    5

<210> 149  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 149  
 Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu  
 1                    5

<210> 150  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 150  
 Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr  
 1                    5

<210> 151  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 151  
 Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys  
 1                    5

<210> 152  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 152  
 Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu  
 1                    5

<210> 153  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 153  
 Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys  
 1                    5

<210> 154  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

---

<400> 154  
Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu  
1 5

<210> 155  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 155  
Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr  
1 5

<210> 156  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 156  
Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys  
1 5

<210> 157  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 157  
Asn Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys  
1 5 10

<210> 158  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 158  
Ala Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu  
1 5 10

<210> 159  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 159  
Val Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr  
1 5 10

<210> 160  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 160  
Glu Val Ser Val Pro Leu Lys Leu Tyr Cys  
1 5 10

<210> 161  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 161  
Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu  
1 5

<210> 162  
<211> 8  
<212> PRT

---

<213> 智人(Homo sapiens)  
<400> 162  
His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser  
1 5

<210> 163  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 163  
Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln  
1 5

<210> 164  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 164  
Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys  
1 5

<210> 165  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 165  
Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg  
1 5

<210> 166  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 166  
Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro  
1 5

<210> 167  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 167  
Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys  
1 5

<210> 168  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 168  
Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro  
1 5

<210> 169  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 169  
Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro  
1 5

<210> 170

---

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 170  
 Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly  
 1 5

<210> 171  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 171  
 Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser  
 1 5

<210> 172  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 172  
 Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr  
 1 5

<210> 173  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 173  
 Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys  
 1 5

<210> 174  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 174  
 Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala  
 1 5

<210> 175  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 175  
 Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys  
 1 5

<210> 176  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 176  
 Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln  
 1 5

<210> 177  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 177  
 Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly  
 1 5

---

<210> 178  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 178  
Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu  
1 5

<210> 179  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 179  
Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser  
1 5

<210> 180  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 180  
His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln  
1 5

<210> 181  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 181  
Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys  
1 5

<210> 182  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 182  
Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg  
1 5

<210> 183  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 183  
Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro  
1 5

<210> 184  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 184  
Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys  
1 5

<210> 185  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 185

Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro  
1 5

<210> 186  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 186  
Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro  
1 5

<210> 187  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 187  
Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly  
1 5

<210> 188  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 188  
Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser  
1 5

<210> 189  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 189  
Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr  
1 5

<210> 190  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 190  
Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys  
1 5

<210> 191  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 191  
Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala  
1 5

<210> 192  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 192  
Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys  
1 5

<210> 193  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 193  
Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln  
1 5

<210> 194  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 194  
Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly  
1 5

<210> 195  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 195  
Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu  
1 5

<210> 196  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 196  
Gly His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln  
1 5 10

<210> 197  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 197  
His Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys  
1 5 10

<210> 198  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 198  
Glu Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg  
1 5 10

<210> 199  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 199  
Pro Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro  
1 5 10

<210> 200  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 200  
Ala Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys  
1 5 10

<210> 201  
<211> 10

---

<212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 201  
 Ala Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro  
 1 5 10

<210> 202  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 202  
 Lys Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro  
 1 5 10

<210> 203  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 203  
 Glu Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly  
 1 5 10

<210> 204  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 204  
 Ser Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser  
 1 5 10

<210> 205  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 205  
 Gln Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr  
 1 5 10

<210> 206  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 206  
 Cys Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys  
 1 5 10

<210> 207  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 207  
 Arg Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala  
 1 5 10

<210> 208  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 208  
 Pro Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys  
 1 5 10



---

<210> 209  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 209  
 Cys Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln  
 1 5 10

<210> 210  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 210  
 Pro Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly  
 1 5 10

<210> 211  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 211  
 Pro Gly Ser Tyr Lys Ala Lys Gln Gly Glu  
 1 5 10

<210> 212  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 212  
 Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys  
 1 5

<210> 213  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 213  
 Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His  
 1 5

<210> 214  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 214  
 Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn  
 1 5

<210> 215  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 215  
 Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn  
 1 5

<210> 216  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 216  
 Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe

---

1                    5

<210> 217  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 217  
 Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr  
 1                    5

<210> 218  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 218  
 Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg  
 1                    5

<210> 219  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 219  
 Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala  
 1                    5

<210> 220  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 220  
 His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp  
 1                    5

<210> 221  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 221  
 Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser  
 1                    5

<210> 222  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 222  
 Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp  
 1                    5

<210> 223  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 223  
 Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser  
 1                    5

<210> 224  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 224  
 Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala  
 1 5

<210> 225  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 225  
 Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp  
 1 5

<210> 226  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 226  
 Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser  
 1 5

<210> 227  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 227  
 Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala  
 1 5

<210> 228  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 228  
 Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys  
 1 5

<210> 229  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 229  
 Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His  
 1 5

<210> 230  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 230  
 Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn  
 1 5

<210> 231  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 231  
 Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn  
 1 5

<210> 232  
 <211> 9  
 <212> PRT

---

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 232  
Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe  
1 5

<210> 233  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 233  
Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr  
1 5

<210> 234  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 234  
Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg  
1 5

<210> 235  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 235  
Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala  
1 5

<210> 236  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 236  
Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp  
1 5

<210> 237  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 237  
His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser  
1 5

<210> 238  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 238  
Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp  
1 5

<210> 239  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 239  
Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser  
1 5

<210> 240

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 240  
 Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala  
 1 5

<210> 241  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 241  
 Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp  
 1 5

<210> 242  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 242  
 Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser  
 1 5

<210> 243  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 243  
 Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala  
 1 5

<210> 244  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 244  
 Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys  
 1 5

<210> 245  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 245  
 Pro Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn  
 1 5 10

<210> 246  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 246  
 Ala Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn  
 1 5 10

<210> 247  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 247  
 Ala Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe  
 1 5 10

<210> 248  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 248  
 Ser Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr  
 1 5 10  
  
 <210> 249  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 249  
 Ile Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg  
 1 5 10  
  
 <210> 250  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 250  
 Cys Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 251  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 251  
 Thr Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp  
 1 5 10  
  
 <210> 252  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 252  
 Cys His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser  
 1 5 10  
  
 <210> 253  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 253  
 His Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp  
 1 5 10  
  
 <210> 254  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 254  
 Asn Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser  
 1 5 10  
  
 <210> 255  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 255

Asn Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala  
1 5 10

<210> 256  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 256  
Phe Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp  
1 5 10

<210> 257  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 257  
Tyr Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser  
1 5 10

<210> 258  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 258  
Arg Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala  
1 5 10

<210> 259  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 259  
Ala Asp Ser Asp Ser Ala Asp Ser Ala Cys  
1 5 10

<210> 260  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 260  
Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp  
1 5

<210> 261  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 261  
Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp  
1 5

<210> 262  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 262  
Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu  
1 5

<210> 263  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 263  
Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu  
1 5

<210> 264  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 264  
Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr  
1 5

<210> 265  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 265  
Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn  
1 5

<210> 266  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 266  
Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val  
1 5

<210> 267  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 267  
Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile  
1 5

<210> 268  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 268  
Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys  
1 5

<210> 269  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 269  
Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys  
1 5

<210> 270  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 270  
Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys  
1 5

<210> 271  
<211> 8



---

<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 271  
Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys  
1 5

<210> 272  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 272  
Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His  
1 5

<210> 273  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 273  
Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly  
1 5

<210> 274  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 274  
Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala  
1 5

<210> 275  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 275  
Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp  
1 5

<210> 276  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 276  
Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu  
1 5

<210> 277  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 277  
Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu  
1 5

<210> 278  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 278  
Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr  
1 5

---

<210> 279  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 279  
Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn  
1 5

<210> 280  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 280  
Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val  
1 5

<210> 281  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 281  
Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile  
1 5

<210> 282  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 282  
Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys  
1 5

<210> 283  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 283  
Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys  
1 5

<210> 284  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 284  
Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys  
1 5

<210> 285  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 285  
Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys  
1 5

<210> 286  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 286  
Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His

---

1                    5

<210> 287  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 287  
 Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly  
 1                    5

<210> 288  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 288  
 Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala  
 1                    5

<210> 289  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 289  
 Pro Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu  
 1                    5                    10

<210> 290  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 290  
 Arg Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu  
 1                    5                    10

<210> 291  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 291  
 Asp Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr  
 1                    5                    10

<210> 292  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 292  
 Leu Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn  
 1                    5                    10

<210> 293  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 293  
 Gly Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val  
 1                    5                    10

<210> 294  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 294  
 Gly Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile  
 1 5 10

<210> 295  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 295  
 Arg Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys  
 1 5 10

<210> 296  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 296  
 Asp Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys  
 1 5 10

<210> 297  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 297  
 Asp Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys  
 1 5 10

<210> 298  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 298  
 Leu Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys  
 1 5 10

<210> 299  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 299  
 Leu Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His  
 1 5 10

<210> 300  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 300  
 Tyr Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly  
 1 5 10

<210> 301  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 301  
 Asn Val Ile Cys Lys Lys Cys His Gly Ala  
 1 5 10

<210> 302  
 <211> 8  
 <212> PRT

---

<213> 智人(Homo sapiens)  
<400> 302  
Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala  
1 5

<210> 303  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 303  
Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val  
1 5

<210> 304  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 304  
Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn  
1 5

<210> 305  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 305  
Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile  
1 5

<210> 306  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 306  
Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr  
1 5

<210> 307  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 307  
Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr  
1 5

<210> 308  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 308  
Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn  
1 5

<210> 309  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 309  
Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln  
1 5

<210> 310

---

<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 310  
Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala  
1 5

<210> 311  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 311  
Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala  
1 5

<210> 312  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 312  
Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro  
1 5

<210> 313  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 313  
Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser  
1 5

<210> 314  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 314  
Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu  
1 5

<210> 315  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 315  
Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val  
1 5

<210> 316  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 316  
Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro  
1 5

<210> 317  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 317  
Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr  
1 5

---

<210> 318  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 318  
Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu  
1 5

<210> 319  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 319  
Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg  
1 5

<210> 320  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 320  
Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu  
1 5

<210> 321  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 321  
Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His  
1 5

<210> 322  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 322  
Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser  
1 5

<210> 323  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 323  
Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser  
1 5

<210> 324  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 324  
Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser  
1 5

<210> 325  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 325

---

Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly  
1 5

<210> 326  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 326  
Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser  
1 5

<210> 327  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 327  
Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser  
1 5

<210> 328  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 328  
His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu  
1 5

<210> 329  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 329  
Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val  
1 5

<210> 330  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 330  
Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn  
1 5

<210> 331  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 331  
Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile  
1 5

<210> 332  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 332  
Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr  
1 5

<210> 333  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)



<400> 333  
Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr  
1 5

<210> 334  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 334  
Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn  
1 5

<210> 335  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 335  
Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln  
1 5

<210> 336  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 336  
Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala  
1 5

<210> 337  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 337  
Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala  
1 5

<210> 338  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 338  
Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro  
1 5

<210> 339  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 339  
Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser  
1 5

<210> 340  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 340  
Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu  
1 5

<210> 341  
<211> 9

---

<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 341  
Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val  
1 5

<210> 342  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 342  
Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro  
1 5

<210> 343  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 343  
Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr  
1 5

<210> 344  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 344  
Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu  
1 5

<210> 345  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 345  
Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg  
1 5

<210> 346  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 346  
Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu  
1 5

<210> 347  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 347  
Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His  
1 5

<210> 348  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 348  
Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser  
1 5

---

<210> 349  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 349  
Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser  
1 5

<210> 350  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 350  
Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser  
1 5

<210> 351  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 351  
Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly  
1 5

<210> 352  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 352  
Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser  
1 5

<210> 353  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 353  
Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser  
1 5

<210> 354  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 354  
Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu  
1 5

<210> 355  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 355  
Pro Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn  
1 5 10

<210> 356  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 356  
Leu Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile

---

1                    5                    10

<210> 357  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 357  
 Pro Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr  
 1                    5                    10

<210> 358  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 358  
 Pro Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr  
 1                    5                    10

<210> 359  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 359  
 Arg Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn  
 1                    5                    10

<210> 360  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 360  
 Tyr Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln  
 1                    5                    10

<210> 361  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 361  
 Ala Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala  
 1                    5                    10

<210> 362  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 362  
 Ala Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala  
 1                    5                    10

<210> 363  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 363  
 Val Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro  
 1                    5                    10

<210> 364  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 364  
Asn Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser  
1 5 10

<210> 365  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 365  
Ile Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu  
1 5 10

<210> 366  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 366  
Thr Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val  
1 5 10

<210> 367  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 367  
Thr Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro  
1 5 10

<210> 368  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 368  
Asn Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr  
1 5 10

<210> 369  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 369  
Gln Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu  
1 5 10

<210> 370  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 370  
Ala Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg  
1 5 10

<210> 371  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 371  
Ala Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu  
1 5 10

<210> 372  
<211> 10  
<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 372  
 Pro Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His  
 1 5 10  
 <210> 373  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 373  
 Ser Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser  
 1 5 10  
 <210> 374  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 374  
 Glu Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser  
 1 5 10  
 <210> 375  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 375  
 Val Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser  
 1 5 10  
 <210> 376  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 376  
 Pro Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly  
 1 5 10  
 <210> 377  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 377  
 Thr Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser  
 1 5 10  
 <210> 378  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 378  
 Leu Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser  
 1 5 10  
 <210> 379  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
 <400> 379  
 Arg Leu His Ser Ser Ser Gly Ser Ser Leu  
 1 5 10  
 <210> 380

---

<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 380  
Gln Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp  
1 5

<210> 381  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 381  
Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala  
1 5

<210> 382  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 382  
Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg  
1 5

<210> 383  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 383  
Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr  
1 5

<210> 384  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 384  
Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val  
1 5

<210> 385  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 385  
Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val  
1 5

<210> 386  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 386  
Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln  
1 5

<210> 387  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 387  
Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val  
1 5

---

<210> 388  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 388  
Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg  
1 5

<210> 389  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 389  
Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala  
1 5

<210> 390  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 390  
Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg  
1 5

<210> 391  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 391  
Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr  
1 5

<210> 392  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 392  
Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val  
1 5

<210> 393  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 393  
Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala  
1 5

<210> 394  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 394  
Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly  
1 5

<210> 395  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 395



---

Gln Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala  
1 5

<210> 396  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 396  
Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg  
1 5

<210> 397  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 397  
Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr  
1 5

<210> 398  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 398  
Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val  
1 5

<210> 399  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 399  
Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val  
1 5

<210> 400  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 400  
Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln  
1 5

<210> 401  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 401  
Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val  
1 5

<210> 402  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 402  
Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg  
1 5

<210> 403  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 403  
 Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala  
 1 5

<210> 404  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 404  
 Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg  
 1 5

<210> 405  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 405  
 Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr  
 1 5

<210> 406  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 406  
 Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val  
 1 5

<210> 407  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 407  
 Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala  
 1 5

<210> 408  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 408  
 Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly  
 1 5

<210> 409  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 409  
 Gln Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg  
 1 5 10

<210> 410  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 410  
 Leu Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr  
 1 5 10

<210> 411  
 <211> 10

---

<212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 411  
 Asp Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val  
 1 5 10

<210> 412  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 412  
 Gly Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val  
 1 5 10

<210> 413  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 413  
 Leu Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln  
 1 5 10

<210> 414  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 414  
 Arg Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val  
 1 5 10

<210> 415  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 415  
 Pro Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg  
 1 5 10

<210> 416  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 416  
 Asp Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala  
 1 5 10

<210> 417  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 417  
 Ala Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg  
 1 5 10

<210> 418  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)

<400> 418  
 Arg Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr  
 1 5 10

<210> 419  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 419  
 Tyr Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val  
 1 5 10  
  
 <210> 420  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 420  
 Val Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 421  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 421  
 Val Gln Val Arg Ala Arg Thr Val Ala Gly  
 5 10  
  
 <210> 422  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 422  
 tcgtatacat ttcttacatc tatgcgctgg aagagacct catggacaca aa 52  
  
 <210> 423  
 <211> 108  
 <212> DNA  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 423  
 gggacaagtt tgtacaaaa agcaggctac gaaggagata tacatatgaa attccttagtc 60  
 aacggtgccc ttgtttttat ggtcgtatac atttcttaca tctatgcg 108  
  
 <210> 424  
 <211> 54  
 <212> DNA  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 424  
 cgggtcgtcg aggtcctcgt cgaagggcct cgtgtagtgg tagtgtagt gcct 54  
  
 <210> 425  
 <211> 61  
 <212> DNA  
 <213> 智人(Homo sapiens)  
  
 <400> 425  
 cctcgtgtag tggtagtggt agtgcctcga atttgggtcg aaagaacatg ttcaccagg 60  
 g 61

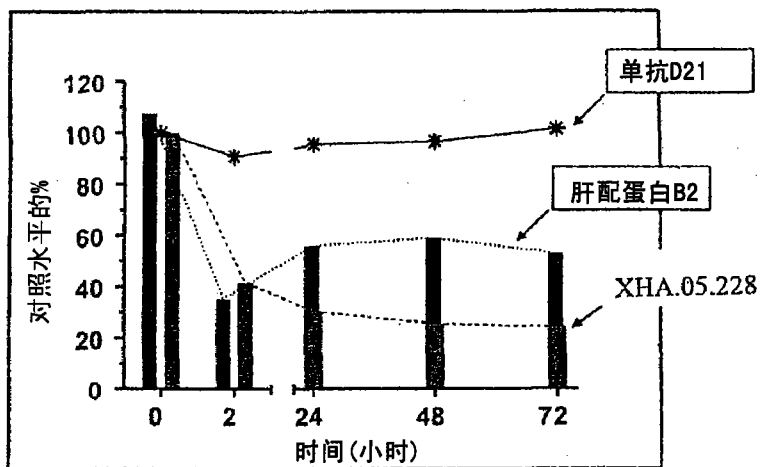
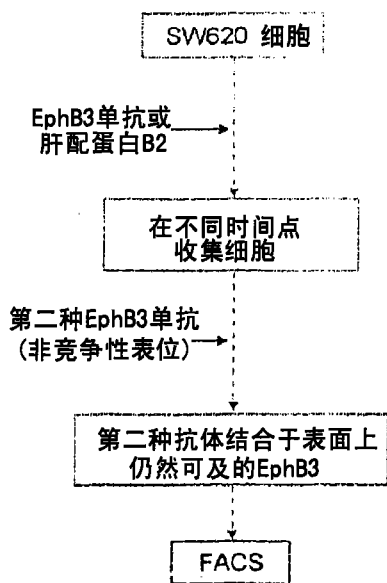


图 1

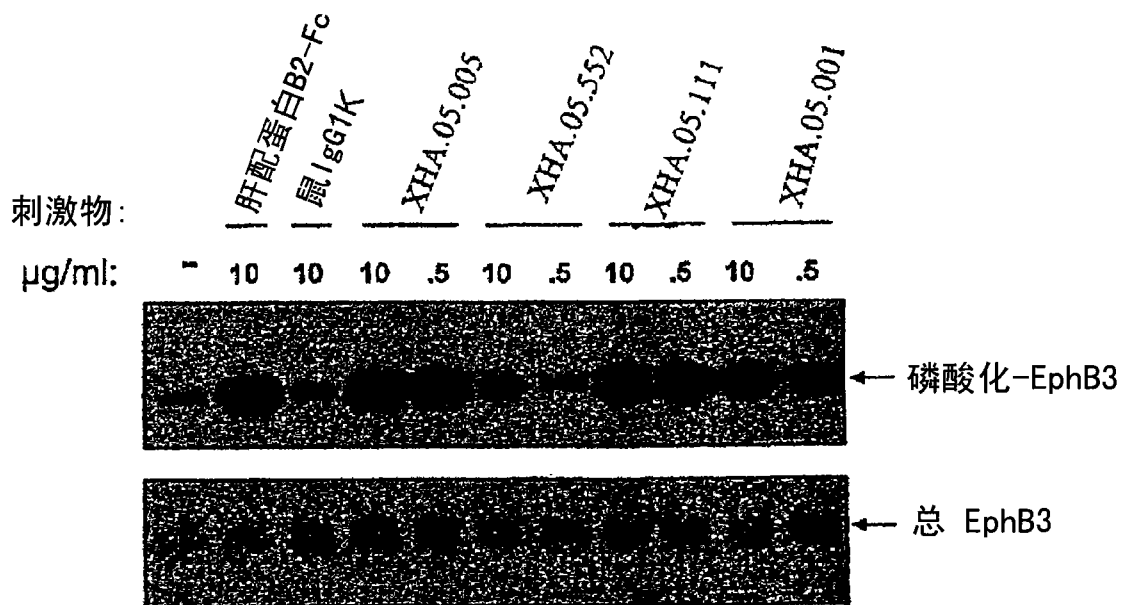


图 2

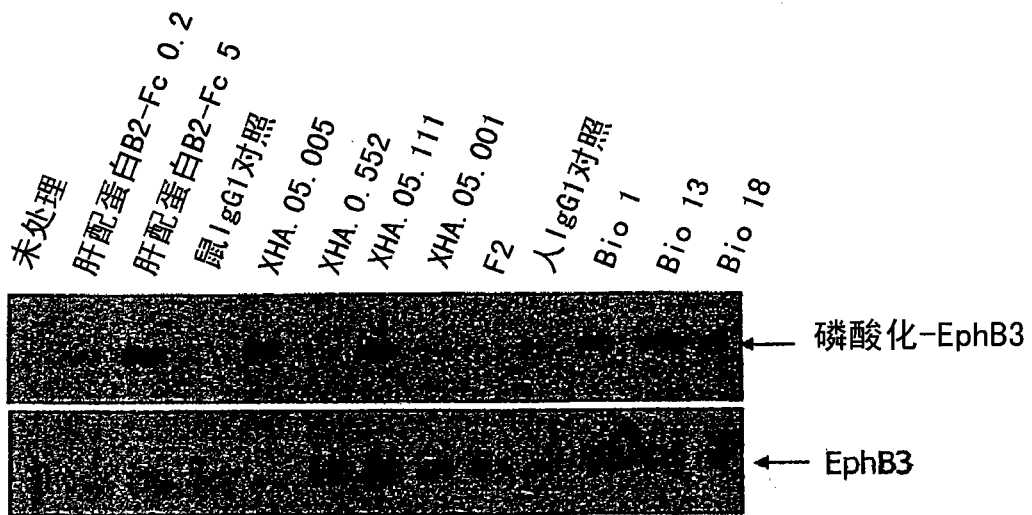


图 3

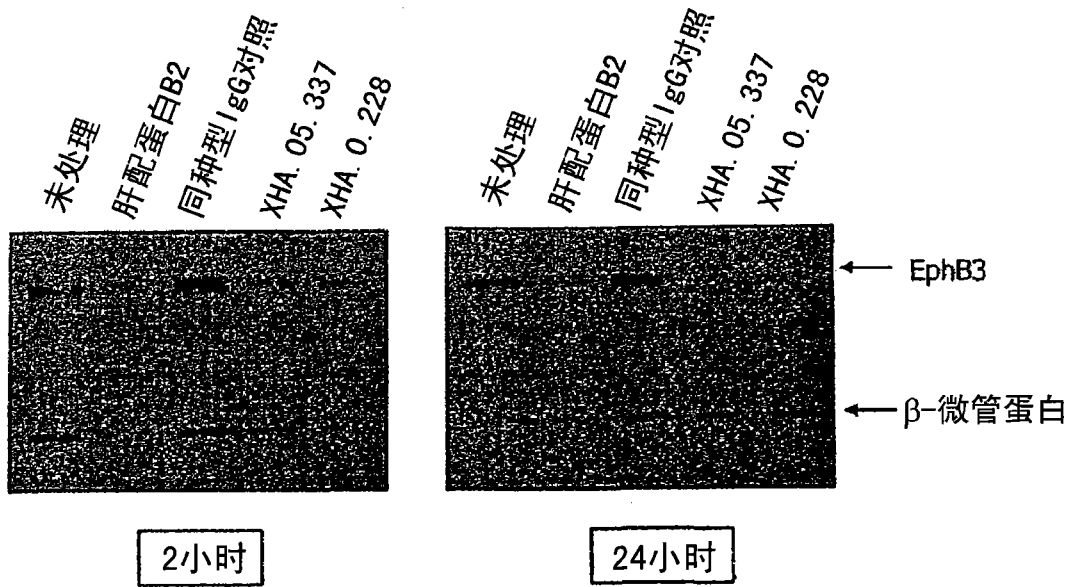


图 4



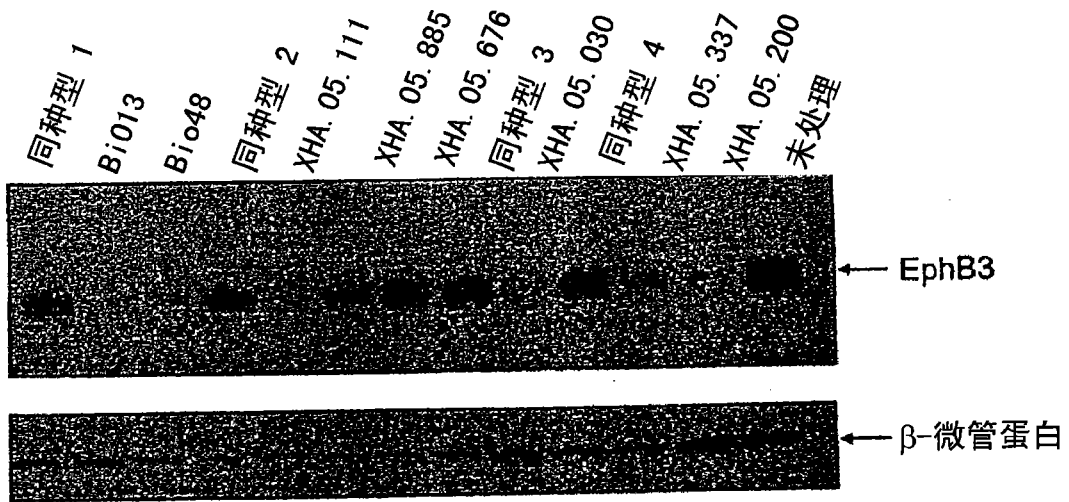


图 5

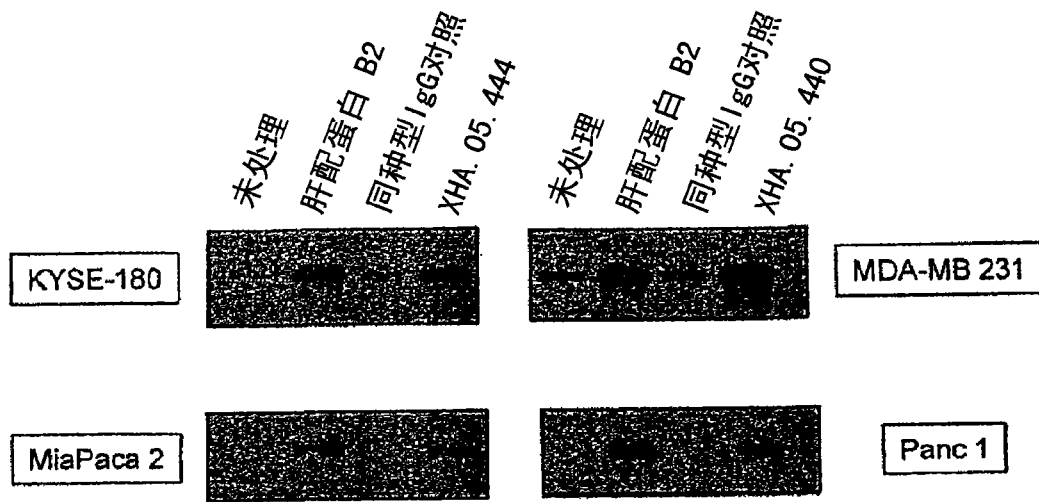


图 6

